



CT/FR 99/02643

FR99/2643<sup>4</sup>

# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

REC'D 29 NOV 1999	
WIPO	PCT

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **16 NOV. 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS Cédex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

---

## BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa  
N° 55-1328

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

25 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

30 OCT. 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 13693-

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

30.10.98

1

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET LAVOIX

2 Place d'Estienne d'Orves

75441 PARIS CEDEX 09

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

BFF 98/0346

53-20-14-20

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention☐ demande divisionnaire

demande initiale

☐ certificat d'utilité☐ transformation d'une demande  
de brevet européen☐ brevet d'invention☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Acides nucléiques et polypeptides spécifiques des souches pathogènes du genre Neisseria.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

1) PASTEUR MERIEUX Sérums &amp; Vaccins

2) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM)

Nationalité (s)

Française

Adresse (s) complète (s)

Pays

1) 58, avenue Leclerc 69348 LYON CEDEX 07

2) 101 Rue de Tolbiac, 75013 PARIS

FR  
FREn cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S)

Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et ~~CABINET LAVOIX~~)

M. NONCHERY n° 92.1179

A. Nonchery

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

**DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS**

26bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Tél. : (1) 42 94 52 52 - Télécopie : (1) 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 13693

**TITRE DE L'INVENTION :** Acides nucléiques et polypeptides spécifiques des  
souches pathogènes du genre Neisseria.

**LE (S) SOUSSIGNÉ (S)**

- 1) PASTEUR MERIEUX Sérums & Vaccins  
2) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE  
(INSERM)  
1) 58, avenue Leclerc 69348 LYON CEDEX 07 FRANCE  
2) 101 Rue de Tolbiac, 75013 PARIS FRANCE

**Désignent en tant qu'inventeurs :**

AUJAME Luc  
477, chemin du Puits 69210 FLEURIEUX sur l'ARBRESLE FRANCE

BOUCHARDON Annabelle  
7, rue Nicolai 69007 LYON FRANCE

RENAULD-MONGENIE Geneviève  
24, rue des Framboisiers 69630 CHAPONOST FRANCE

ROKBI Bachra  
254, rue Vendôme 69003 LYON FRANCE

NASSIF Xavier  
1, Square Charles Laurent 75015 PARIS FRANCE

TINSLEY Colin  
16, Square Jean Thébaud 75015 PARIS FRANCE

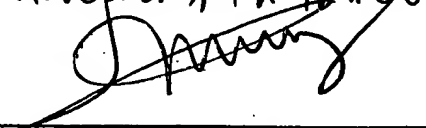
PERRIN Agnès  
33 bis, rue du Docteur Roux 75015 PARIS FRANCE

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 27 Octobre 1999

CABINET LAVOIX  
M. MONCHENY n° 92.1179

H. ODBLENSKY n° 92.1186



La présente invention a trait à des acides nucléiques codant pour des polypeptides spécifiques des souches pathogènes du genre *Neisseria*, notamment utiles pour prévenir ou traiter une infection par *Neisseria meningitidis*.

5 D'une manière générale, les méningites sont soit d'origine virale, soit d'origine bactérienne. Les bactéries principalement responsables sont : *Haemophilus influenzae* de type b, *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pneumoniae*. L'espèce *Neisseria meningitidis* est subdivisée en sérogroupes selon la nature des polysaccharides capsulaires. Bien qu'il existe une  
10 douzaine de sérogroupes, 90% des cas de méningites sont attribuables à trois sérogroupes : A, B et C.

Il existe des vaccins efficaces à base de polysaccharides capsulaires pour prévenir les méningites à *Neisseria meningitidis* sérogroupes A et C. Ces polysaccharides tels quels ne sont que peu ou pas immunogènes  
15 chez les enfants de moins de deux ans et n'induisent pas de mémoire immunitaire. Toutefois, ces inconvénients peuvent être surmontés en conjuguant ces polysaccharides à une protéine porteuse.

En revanche, le polysaccharide de *Neisseria meningitidis* séro groupe B n'est pas ou peu immunogène chez l'homme, qu'il soit sous  
20 forme conjuguée ou non. Ainsi il apparaît hautement souhaitable de rechercher un vaccin à l'encontre des méningites causées par *Neisseria meningitidis*, notamment du séro groupe B, autre qu'un vaccin à base de polysaccharide.

A cette fin, différentes protéines de la membrane externe de *N. meningitidis*  
25 ont déjà été proposées, telles que le récepteur membranaire de la transferrine humaine (WO 90/12591 et WO93/06861).

*Neisseria meningitidis* est génétiquement très proche de *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria lactamica*. *N. gonorrhoeae* est surtout responsable d'infections localisées dans le tractus urogénital. Elle colonise la  
30 muqueuse génitale, puis traverse l'épithélium, envahit ensuite le sous-épithélium où elle se multiplie et est responsable d'une forte réaction

inflammatoire. Par contre, *N. lactamica* est considérée comme une espèce non pathogène.

La demande de brevet WO98/02547 divulgue un certain nombre de séquences nucléotidiques issues de la souche de *N. meningitidis* Z2491 qui s'hybrident avec le génome de *N. gonorrhoeae* et ne s'hybrident pas avec le génome de *N. lactamica*. Par extension de langage, ces séquences sont dites présentes chez *N. meningitidis* et *N. gonorrhoeae* (bien qu'elles ne soient pas forcément présentes à l'identique) et absentes de *N. lactamica*. Les auteurs de cette demande PCT spéculent que les gènes des souches de *Neisseria* pathogènes situés aux alentours des séquences identifiées devraient également être absents de *N. lactamica*. Dans la mesure où ces gènes peuvent être spécifiques des souches pathogènes du genre *Neisseria*, les polypeptides pour lesquels ils codent ont un intérêt potentiel en tant qu'antigènes vaccinaux. Néanmoins cette demande de brevet ne divulgue pas quels pourraient être ces gènes et encore moins leurs séquences, même partielles.

Les auteurs de la présente invention sont maintenant parvenus à identifier certains de ces gènes en recherchant dans le génome du méningocoque, les cadres de lecture ouverts spécifiques des souches pathogènes du genre *Neisseria*, en mettant en oeuvre la stratégie suivante :

Certaines des séquences divulguées dans la demande de brevet WO98/02547 (SEQ ID n° 66, 67, 69, 70, 72 à 96, 98, et 99), ont été positionnées sur la séquence du génome de la souche *N. meningitidis* de sérogroupe B (ATCC 13090), disponible à partir de la banque Pathoseq® d'Incyte Pharmaceuticals ainsi que sur la séquence du génome de la souche *Neisseria meningitidis* Z2491 (Sanger Center). Ceci a permis d'identifier, dans le génome de *N. meningitidis* qui compte 2,3 Méga bases, 19 contigs représentant 220 000 paires de bases.

Les auteurs de la présente invention ont ensuite analysé, pour chacun des 19 contigs, la présence de phases de lecture ouvertes ("open reading frames-ORF"), contenant au moins 100 acides aminés (et par

définition, bornées par un codon d'initiation et un codon stop), à l'aide du logiciel Gene Jockey II sequence processor<sup>®</sup> (Biosoft). Cette analyse a permis de sélectionner environ 400 ORFs candidates.

Les séquences de chacune de ces ORFs ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel Codon Use<sup>®</sup> (Conrad Halling), qui tient compte de la fréquence d'utilisation des codons chez *N. meningitidis*. N'ont été retenues que les ORFs dont les séquences présentent une fréquence d'utilisation maximale de ces codons. A l'issue de cette analyse, 197 ORFs candidates ont été retenues.

Les ORFs sélectionnées par cette double analyse ont été soumises à une recherche d'homologies sur l'ensemble des banques disponibles à l'aide du programme BLASTX<sup>®</sup> depuis l'accès à la banque Pathoseq<sup>®</sup> d'Incyte Pharmaceuticals. Cette recherche d'homologies a permis d'exclure les ORFs codant *a priori* pour des protéines cytoplasmiques ou périsplasmiques, en particulier des protéines du métabolisme. Les ORFs ont également été soumises à une analyse des motifs protéiques éventuels, à l'aide du programme Protean<sup>®</sup> de DNA Star (Lasergene software).

Les auteurs de la présente invention ont ensuite recherché si les ORFs retenues à l'issue de l'étape précédente (au nombre de 118) étaient effectivement absentes de *N. lactamica*, comme le prévoyait la demande de l'art antérieur WO 98/02547.

A cette fin, une amplification par PCR a été mise en œuvre. Cette amplification s'est révélée inopérante pour 78 des 118 ORFs testées. Seules les ORFs pour lesquelles l'amplification chez *N. lactamica* était négative (séquences appelées "lactamica<sup>-</sup>") ont été retenues. Afin de vérifier que ces résultats négatifs n'étaient pas des "faux-négatifs", les séquences lactamica<sup>-</sup> retenues ont été soumises à un contrôle par dot blot. A l'issue de cette étape, seules 23 ORFs ont été confirmées *N. meningitidis*<sup>+</sup>/*N. lactamica*<sup>-</sup>.

Enfin, ces 23 ORFs ont été repositionnées dans leur ensemble sur le génome de *N. meningitidis* ATCC13090. Ceci a permis de mettre en

évidence que trois ORFs préalablement éliminées sur la base de leur fonction protéique putative, apparaissaient localisées à proximité ou même encadrées par certaines des 23 ORFs *N. meningitidis*<sup>+</sup> / *N. lactamica*<sup>-</sup>. Ces trois ORFs (SEQ ID n° 29, 35 et 37) ont été réintroduites dans l'étude, et il s'est avéré qu'elles étaient elles aussi *N. meningitidis*<sup>+</sup> / *N. lactamica*<sup>-</sup>.

Les auteurs de la présente invention ont ensuite cherché à savoir si les ORFs identifiées à partir du génome de la souche *N. meningitidis* de séro groupe B ATCC 13090 étaient aussi présentes dans les génomes de *N. meningitidis* Z2491 (Sanger Center) de séro groupe A et de *N. gonorrhoeae* FA1090 (Advanced Center of Genome Technology, Oklahoma University). Puis ils ont comparé les séquences dérivées de ces différents génomes, par alignement multiple (Clustal, Infobiogen). Ceci a permis de redéfinir pour certaines des ORFs la position la plus probable des codons d'initiation et de fin de traduction. Les séquences des cadres de lecture ouverts issues de la souche ATCC13090 sont données dans les SEQ ID N° 1 - 51 (numéros impairs) et les séquences d'acides aminés qui en sont déduites, dans les SEQ ID N° 2 - 52 (numéros pairs).

La présente invention a donc pour objet un acide nucléique sous forme isolée codant pour un polypeptide, ou un fragment antigénique de celui-ci à l'exclusion des acides nucléiques divulgués dans les SEQ ID n° 70, 73, 74, 77, 80, 81, 87, 88, 89, 94, 95 et 98 de la demande WO 98/02547 (séquences annexées à la présente description) ; ledit polypeptide ayant une séquence d'acides aminés qui est identique ou homologue à une séquence choisie parmi celles du groupe II ; le groupe II étant constitué par les séquences montrées dans les SEQ ID n° 2 - 52 (numéros pairs) et la séquence SEQ ID n°53.

De manière préférentielle, ledit acide nucléique peut avoir une séquence nucléotidique choisie parmi celles du groupe I, le groupe I étant constitué par les séquences montrées dans les SEQ ID n°1-51 (numéros impairs).

Le terme « acide nucléique » inclut et signifie également ORF, gène, polynucléotide, ADN et ARN. Le terme « acide nucléique sous forme isolée » signifie un acide nucléique séparé de l'environnement biologique dans lequel il se trouve dans des conditions naturelles. Par exemple, une molécule d'ADN existe dans des conditions naturelles lorsqu'elle se trouve intégrée dans un génome ou bien lorsqu'elle fait partie d'une banque de gènes. Dans ce cas là, elle ne peut être sous forme isolée. Par contre, la même molécule séparée du génome par clonage (par exemple suite à une amplification par PCR) doit être considérée comme étant sous forme isolée. De manière typique, une molécule d'ADN sous forme isolée, ne contient pas les régions codantes qui lui sont contiguës en 5' et 3' dans le génome dont elle est issue. Les acides nucléiques sous forme isolée peuvent être intégrés dans des vecteurs (par exemple plasmides or vecteurs viraux ou bactériens) sans pour cela se départir de leur caractéristique d'être séparés de leur environnement naturel.

Les auteurs de la présente invention ont plus particulièrement trouvé que les ORFs qui, lorsqu'elles étaient issues de la souche ATCC 13090, étaient caractérisées par les séquences telles montrées dans les SEQ ID n° 19, 27, 39, 45, 47 et 49, étaient spécifiques de *Neisseria meningitidis* dans la mesure où il n'a pas été possible de mettre en évidence des séquences identiques ou homologues dans le génome de *N. gonorrhoeae*. Ils ont aussi trouvé que l'ORF caractérisée par la séquence de souche telle que montrée dans le SEQ ID n° 39 était spécifique de *Neisseria meningitidis* de séro groupe B.

L'invention a également pour objet un polypeptide sous forme isolée ou un fragment de celui-ci ; ledit polypeptide ayant une séquence d'acides aminés identique ou homologue à une séquence choisie parmi celles du groupe II.

Les acides aminés encadrés dans la séquence SEQ ID n° 8 correspondent à la séquence signal, l'acide aminé en gras représente le

premier acide aminé de la forme mature. La séquence d'acides aminés de la forme protéique mature est représentée dans le SEQ ID n° 53.

5 Dans le cadre de la présente invention, les termes de " polypeptide " et " protéine " sont équivalents et interchangeables entre eux. Ils désignent n'importe quelle chaîne d'acides aminés, quelle qu'en soit sa longueur et ses modifications post-traductionnelles (par exemple, phosphorylation ou glycosylation).

10 Par " fragments antigéniques des polypeptides spécifiques des souches pathogènes du genre *Neisseria* ", on entend les polypeptides dérivés des polypeptides de l'invention tels que définis précédemment, par des délétions de parties desdits polypeptides sans destruction de l'antigénicité (par exemple, sans perte notable de l'activité antigénique) desdits polypeptides.  
15 L'antigénicité spécifique peut être déterminée en utilisant diverses méthodes connues de l'homme du métier, comme expliqué plus loin.

Ces fragments ont de préférence au moins 12 acides aminés de long, de préférence encore au moins 20 acides aminés de long, préférentiellement 50 acides aminés de long, de préférence encore 75 acides aminés de long, préférentiellement 100 acides aminés de long.  
20

Ces fragments peuvent être utilisés pour révéler des épitopes qui peuvent être masqués chez les polypeptides parents. Ils sont également  
avantageux pour induire une réponse immune protectrice dépendante des lymphocytes T. Les délétions peuvent en effet permettre d'éliminer des régions  
25 immunodominantes de haute variabilité entre différentes souches.

De tels fragments peuvent être obtenus en utilisant des techniques standard connues de l'homme du métier (par exemple, Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & sons Inc, 1994), par exemple par PCR, RT-PCR, traitement par enzymes de restriction des  
30 molécules d'ADN clonées, ou par la méthode de Kunkel et al (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:448).

Par "séquence d'acides aminés homologue", on entend une séquence qui diffère d'une des séquences du groupe II par substitution, délétion, et/ou insertion d'un ou plusieurs acides aminés, à des positions telles que ces modifications ne détruisent pas l'antigénicité spécifique du polypeptide en question.

Lesdites substitutions sont de préférence des substitutions conservatives, c'est-à-dire des substitutions d'acides aminés de même classe, tels que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

De manière avantageuse, une séquence d'acides aminés homologue possède un degré d'homologie (*i.e.*, d'identité) d'au moins 75 % avec une des séquences du groupe II ; de préférence ce degré d'homologie est d'au moins 80 %, de manière tout à fait préférée, d'au moins 90 %. Les séquences d'acides aminés homologues incluent en particulier les séquences qui sont substantiellement identiques à une des séquences du groupe II. Par "séquence substantiellement identique" on signifie une séquence dont le degré d'homologie (*i.e.*, d'identité) avec une des séquences du groupe II est d'au moins 90%, avantageusement d'au moins 95%, de préférence d'au moins 97%, de manière tout à fait préférée d'au moins 99%. De plus, elle peut ne différer de la séquence de référence que par une majorité de substitutions conservatives.

Le degré d'homologie (aussi appelé degré d'identité) est généralement déterminé en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont

alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (*i.e.* identité). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces ("gaps") dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie (*i.e.* identité) est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

Par "séquences nucléotidiques homologues", on entend des séquences qui diffèrent des séquences du groupe I par substitution d'un nucléotide ou plusieurs nucléotides, ou par délétion et/ou insertion d'un ou plusieurs codons, à des positions telles que ces séquences codent (i) toujours pour des polypeptides ayant les séquences du groupe II, par effet de la dégénérescence du code génétique; ou bien (ii) pour des polypeptides possédant des séquences homologues tels que définies précédemment.

De manière avantageuse, une séquence nucléotidique homologue possède un degré d'homologie d'au moins 60 % avec une des séquences du groupe I; de préférence ce degré d'homologie est d'au moins 80 %, de manière tout à fait préférée d'au moins 90 %.

De manière typique, une séquence nucléotidique homologue s'hybride spécifiquement aux séquences complémentaires des séquences du groupe I dans des conditions stringentes. La température à laquelle le test d'hybridation est mis en œuvre constitue un facteur important influençant la stringence. De manière conventionnelle, cette température, dite température d'hybridation ( $T_h$ ), est choisie de 5 à 40°C, de préférence de 20 à 25°C au dessous de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent ( $T_m$ ). De manière générale, on considère que des conditions de forte stringence sont remplies lorsque  $T_h$  est inférieure à  $T_m$  de 5 à 25°C approximativement, par exemple de 5 à 10°C ou le plus souvent, de 20 à 25°C approximativement. Une stringence modérée s'établit lorsque  $T_h$  est inférieure à  $T_m$  de 30 à 40°C.

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, la température  $T_m$  est définie par la relation :  $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) +$

16,6Log(concentration en cations) – 0,63(%formamide) – (600/nombre de bases). Ainsi, la force ionique a un impact majeur sur la valeur de T<sub>m</sub>. La température T<sub>m</sub> augmente de 16,6°C chaque fois que la concentration en cation monovalent augmente d'un facteur 10. L'addition de formamide dans le tampon d'hybridation fait par contre baisser la valeur de T<sub>m</sub>. (Pour une

5 référence complète voir Sambrook et al, Molecular Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989, pages 9.54-9.62).

De manière conventionnelle, les expériences d'hybridation sont conduites à une température de 60 à 68°C, par exemple à 65°C. A cette

10 température, des conditions d'hybridation stringentes peuvent être par exemple mises en œuvre en 6xSSC, avantageusement en 2xSSC ou 1xSSC, de préférence, en 0,5xSSC, 0,3xSSC ou 0,1xSSC (en absence de formamide). Une solution de 1xSSC contient 0,15 M de NaCl et 0,015 de citrate de sodium.

15 C'est pourquoi, en d'autres termes, l'invention a pour objet un polynucléotide sous forme isolée, qui est capable de s'hybrider dans des conditions stringentes avec une molécule d'ADN ayant une des séquences nucléotidiques telles que montrées dans les SEQ ID N° 1 - 51 (numéros impairs) ou leurs complémentaires.

20

Une classe particulière de séquences homologues est constituée par celles que l'on rencontre dans la nature en vertu du phénomène extrêmement fréquent de la variation allélique. Une espèce bactérienne par exemple, *N. meningitidis* ou *N. gonorrhoeae*, est constituée par une grande

25 variété de souches qui diffèrent entre elles par des variations mineures, dites variations alléliques. Ainsi, un polypeptide qui est présent dans différentes souches et qui bien évidemment remplit dans chacune d'entre elles, la même fonction biologique, peut posséder une séquence d'acides aminés qui n'est pas identique d'une souche à l'autre. En d'autres termes, les séquences

30 issues de la variation allélique sont purement des séquences équivalentes ou alternatives à celles du groupe II. La classe de séquences variantes alléliques de l'une des séquences du groupe II est constituée par les séquences du

polypeptide tel qu'il se trouve dans une espèce pathogène du genre *Neisseria* (par exemple *N. meningitidis* ou de *N. gonorrhoeae*) autre que la souche de *N. meningitidis* ATCC 13090. La fonction biologique qui est associée aux séquences variantes alléliques est la même que celle qui est associée à la séquence de référence. Les différences (substitution, délétion ou addition d'un ou plusieurs acides aminés) qu'elles présentent entre elles (y compris la séquence de référence) n'altèrent pas la fonction biologique du polypeptide. Par " fonction biologique ", on entend la fonction exercée par le polypeptide dans les cellules qui le produisent de manière naturelle.

La variation allélique s'exprime également au niveau des séquences codantes. Un polynucléotide codant pour un polypeptide possédant une séquence qui est une variante allélique de l'une des séquences du groupe I peut être facilement cloné par amplification de l'ADN génomique des souches d'espèces pathogènes du genre *Neisseria*, par exemple par PCR (réaction en chaîne par la polymérase), en utilisant des amorces oligonucléotidiques synthétiques capables de s'hybrider au niveau des extrémités 5' et 3' de la région codante. Les séquences de telles amorces peuvent facilement être établies par un homme du métier à partir des séquences nucléotidiques données dans les SEQ ID N° 1 - 51 (numéros impairs). Les amorces ont en général de 10 à 40 nucléotides, de préférence de 15 à 25 nucléotides.

C'est pourquoi, en d'autres termes, l'invention a pour objet une molécule d'ADN sous forme isolée qui peut être amplifiée et/ou clonée par PCR à partir du génome d'une souche de *Neisseria* pathogène en utilisant un couple d'amorces PCR 5' et 3' ; les séquences de ces amorces étant établies à partir d'une des séquences nucléotidiques telles que montrées dans les SEQ ID N° 1 - 51 (numéros impairs). Un exemple est donné pour chaque couple d'amorces dans l'exemple I.1 ci-après.

Les polypeptides de l'invention peuvent être fusionnés à d'autres polypeptides, par exemple par traduction d'un gène hybride. Des vecteurs pour l'expression de polypeptides de fusion sont disponibles dans le

commerce, comme les vecteurs pMal-c2 ou pMal-p2 de New England Biolabs, dans lesquels la protéine à laquelle peuvent être fusionnés les polypeptides de l'invention est une protéine de liaison au maltose, ou le système glutathion-S-transférase de Pharmacia, ou le système His-Tag de Novagen. De tels systèmes sont en particulier utiles pour une purification des polypeptides de l'invention. Les polypeptides de l'invention peuvent être fusionnés à des polypeptides présentant une activité d'adjuvant, comme par exemple la sous-unité B de la toxine cholérique ou de la toxine thermosensible de *E. coli*.

Les acides nucléiques de la présente invention peuvent être utilisés (i) dans un procédé de production des polypeptides codés par lesdits acides nucléiques dans un système hôte recombinant, (ii) pour la construction de vecteurs vaccinaux tels que des poxvirus, destinés à être utilisés dans des méthodes et des compositions de prévention et/ou de traitement d'une infection par les souches pathogènes de *Neisseria*, en particulier par *Neisseria meningitidis*, (iii) comme agent vaccinal sous une forme nue ou en association avec un véhicule favorisant le transfert aux cellules cible et, (iv) dans la construction de souches de *Neisseria* atténuées qui peuvent surexprimer un acide nucléique de l'invention ou l'exprimer sous une forme non toxique, mutée.

La présente invention fournit également (i) une cassette d'expression contenant un polynucléotide de l'invention placée sous le contrôle d'éléments permettant son expression, en particulier sous le contrôle d'un promoteur approprié ; (ii) un vecteur d'expression contenant ladite cassette d'expression ; (iii) une cellule hôte (procaryote ou eucaryote) transformée avec une cassette d'expression et/ou un vecteur d'expression tels que définis ci-dessus, ainsi que (iv) une méthode pour obtenir un polypeptide codé par ledit polynucléotide de l'invention, comprenant la culture de ladite cellule transformée, dans des conditions permettant l'expression du polynucléotide de l'invention, et la récupération du polypeptide de la culture cellulaire.

Parmi les hôtes eucaryotes pouvant être utilisés, on peut notamment citer les cellules de levure (par exemple, *Saccharomyces*

*cerevisiae* ou *Pichia Pastoris*), les cellules de mammifères (par exemple, COS1, NIH3T3, ou JEG3), des cellules d'arthropodes (par exemple, *Spodoptera frugiperda* (SF9)), et des cellules végétales. Parmi les hôtes procaryotes pouvant être utilisés, on peut notamment citer *E. coli*.

5 Le choix de la cassette d'expression dépend du système hôte choisi ainsi que des caractéristiques désirées pour le polypeptide exprimé. De manière générale, les cassettes d'expression incluent un promoteur qui est fonctionnel dans le système hôte sélectionné et qui peut être constitutif ou inductible ; un site de liaison au ribosome ; un codon d'initiation (ATG) ; si  
10 nécessaire une région codant pour un peptide signal ; une séquence nucléotidique de l'invention ; un codon stop ; éventuellement une région 3' terminale (terminateur de traduction et/ou de transcription). Le cadre de lecture ouverte ("open reading frame ORF") constitué par la séquence nucléotidique de l'invention, seule ou associée à la région codant pour le  
15 peptide signal, est placé sous le contrôle du promoteur de telle sorte que la traduction et la transcription aient lieu dans le système hôte. Les promoteurs et les régions codant pour les peptides signal sont connus de l'homme du métier. Parmi ceux-ci, on peut notamment citer le promoteur de *Salmonella typhimurium* inductible par l'arabinose (promoteur araB) et qui est fonctionnel  
20 dans les bactéries Gram<sup>-</sup> tel que *E. coli* (US 5,028,530 et Cagnon et al., Protein Engineering (1991) 4(7) : 843), le promoteur du gène du bactériophage T7 codant pour l'ARN polymérase, (US 4,952,496) ; le peptide signal OspA et RipB (Takase et al, J. Bact. (1987) 169:5692).

Le polypeptide exprimé peut être recueilli sous une forme  
25 pratiquement purifiée à partir de l'extrait cellulaire ou du surnageant après centrifugation de la culture de cellules recombinantes. Le polypeptide recombinant peut être notamment purifié par des méthodes de purification par affinité à l'aide d'anticorps ou par toute autre méthode connue de l'homme du métier, telle que par fusion génétique avec un petit domaine de liaison.

30 Les acides nucléiques de l'invention peuvent également être utiles dans le domaine de la vaccination, soit en utilisant un hôte viral ou

bactérien comme véhicule de libération de l'ADN, soit en administrant l'acide nucléique d'intérêt sous une forme libre.

La présente invention a également pour objet (i) un vecteur vaccinal contenant un acide nucléique de l'invention, placé sous le contrôle d'éléments permettant son expression ; (ii) une composition pharmaceutique contenant une quantité thérapeutiquement ou prophylactiquement efficace dudit vecteur vaccinal ; (iii) une méthode pour induire une réponse immune contre *Neisseria* chez un vertébré, en particulier un mammifère, de préférence un humain, ladite méthode comprenant l'administration audit vertébré d'une quantité immunologiquement efficace dudit vecteur vaccinal pour provoquer une réponse immune, en particulier une réponse protectrice ou thérapeutique à *Neisseria meningitidis* ; (iv) une méthode pour prévenir et/ou traiter une infection par les souches pathogènes de *Neisseria*, en particulier par *Neisseria meningitidis*, qui comprend l'administration d'une quantité prophylactique ou thérapeutique dudit vecteur vaccinal de l'invention à un individu nécessitant un tel traitement.

En association avec les polypeptides de l'invention, le vecteur vaccinal tel que défini ci-dessus peut également comprendre des séquences nucléotidiques dont l'expression permet la stimulation de la réponse immune, telles que les séquences codant pour des cytokines.

Ledit vecteur vaccinal de l'invention peut être administré par n'importe quelle voie conventionnelle dans le domaine de la vaccination, en particulier par la voie parentérale (par exemple, sous-cutanée, intra-dermique, intra-musculaire, intraveineuse ou intra-péritonéale). Le dosage dépend de nombreux paramètres connus de l'homme du métier, tels que le vecteur lui-même, la voie d'administration, le poids, l'âge ou le sexe de l'animal ou de l'homme à vacciner.

La présente invention a également pour objet (i) une composition pharmaceutique contenant une quantité thérapeutiquement ou prophylactiquement efficace d'un polynucléotide de l'invention ; (ii) une méthode pour induire une réponse immune contre les souches pathogènes de *Neisseria*, en particulier par *Neisseria meningitidis* chez un vertébré par

administration audit vertébré d'une quantité immunologiquement efficace dudit polynucléotide pour provoquer une réponse immune, en particulier une réponse immune protectrice envers les souches pathogènes de *Neisseria*, en particulier par *Neisseria meningitidis* ; et (iii) une méthode de prévention et de traitement à une infection par les souches pathogènes de *Neisseria*, en particulier par *Neisseria meningitidis*, par administration d'une quantité thérapeutique ou prophylactique dudit polynucléotide à un individu nécessitant un tel traitement.

Les polynucléotides de l'invention (ADN ou ARN) peuvent être administrés en tant que tels à un vertébré. Lorsqu'une molécule d'ADN de l'invention est utilisée, elle peut être sous la forme d'un plasmide incapable de se répliquer dans une cellule de vertébré et incapable d'intégrer le génome dudit vertébré. Ladite molécule d'ADN est typiquement placée sous le contrôle d'un promoteur adapté pour l'expression dans une cellule de vertébré. Ledit polynucléotide utilisé comme vaccin peut être formulé selon diverses méthodes connues de l'homme du métier. Ledit polynucléotide peut en particulier être utilisé sous une forme nue, exempt de tout véhicule favorisant le transfert à la cellule cible, tels que des liposomes anioniques, des lipides cationiques, des microparticules, par exemple des microparticules d'or, des agents de précipitation, par exemple du phosphate de calcium, ou tout autre agent facilitant la transfection. Dans ce cas, le polynucléotide peut être simplement dilué dans une solution physiologiquement acceptable, telle qu'une solution stérile ou une solution stérile tampon, en présence ou en l'absence d'un véhicule. Lorsqu'il est présent, ce véhicule peut être de préférence isotonique, hypotonique, ou faiblement hypertonique, et a une force ionique relativement faible. Il peut par exemple s'agir d'une solution de saccharose (par exemple une solution contenant 20 % de saccharose).

De manière alternative, un polynucléotide de l'invention peut être associé à des agents qui facilitent la transfection. Il peut être, entre autres, (i) associé à un agent chimique qui modifie la perméabilité cellulaire tel que la bupivacaïne (WO 94/16737) ; (ii) encapsulé dans des liposomes, éventuellement en présence de substances supplémentaires facilitant la

transfection (WO 93/18759, WO 93/19768, WO 94/25608 et WO 95/2397, WO 93/18759 et WO 93/19768) ; ou (iii) associé à des lipides cationiques ou des microparticules de silice, d'or ou de tungstène.

5 Lorsque les polynucléotides de l'invention recouvrent des microparticules, celles-ci peuvent être injectées par voie intradermique ou intraépidermique par la technique du canon à gènes, "gene gun" (US 4,945,050, U.S. No. 5,015,580 et WO 94/24263).

10 La quantité d'ADN à utiliser comme vaccin dépend notamment de la force du promoteur utilisé dans la construction de l'ADN, de l'immunogénicité du produit exprimé, de l'individu auquel cet ADN est administré, du mode d'administration et du type de formulation. De manière générale, une quantité thérapeutiquement ou prophylactiquement efficace variant d'environ 1 µg à environ 1 mg, de préférence d'environ 10 µg à environ 800 µg et, de manière préférentielle d'environ 25 µg à environ 250 µg, peut  
15 être administrée à des adultes humains.

Le polynucléotide de l'invention peut être administré par toute voie d'administration conventionnelle telle que notamment par voie parentérale. Le choix de la voie d'administration dépend en particulier de la formulation choisie. Un polynucléotide formulé en association avec la  
20 bupivacaïne est avantageusement administré au muscle. Lorsque des liposomes neutres ou anioniques ou un lipide cationique tel que DOTMA (chlorure de N-[1-(2,3-dioléyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium) ou DC-Chol (3 beta-(N-(N',N'-diméthyl aminomethane)-carbamoyl) cholesterol), sont utilisés, la formulation peut être avantageusement injectée par voie  
25 intraveineuse, intramusculaire, intradermique ou sous-cutanée. Un polynucléotide sous une forme nue peut de manière avantageuse être administré par voie intramusculaire, intradermique ou sous-cutanée.

Les séquences nucléotidiques de l'invention permettent la construction de sondes et d'amorces nucléotidiques spécifiques utiles en  
30 diagnostic. Lesdites sondes ou amorces sont des acides nucléiques ayant des séquences identiques ou homologues à des portions des séquences du groupe I ou à leurs séquences complémentaires.

De manière préférentielle, lesdites sondes contiennent d'environ 5 à environ 100, de préférence d'environ 10 à environ 80 nucléotides. Elles peuvent contenir des bases modifiées, les résidus sucre et phosphate pouvant être également modifiés ou substitués. Les sondes de l'invention peuvent être  
 5 utilisées dans des tests de diagnostic, pour capturer ou détecter des polynucléotides spécifiques des souches pathogènes de *Neisseria*. De telles sondes de capture peuvent être de manière conventionnelle immobilisées sur un support solide directement ou indirectement, par liaison covalente ou par adsorption passive. Une sonde de détection peut être marquée notamment par  
 10 un isotope radioactif, une enzyme telle que la peroxidase ou la phosphatase alcaline, ou des enzymes capables d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorogène ou luminescent, ou encore par des composés eux-mêmes homogènes, fluorogènes ou luminescents, des analogues nucléotidiques ; ou la biotine.

15 Une amorce contient généralement d'environ 10 à environ 40 nucléotides, et peut être utilisée pour initier une polymérisation enzymatique de l'ADN dans un processus d'amplification (par exemple la PCR), dans un processus d'élongation ou dans une méthode de transcription inverse. Une amorce de l'invention peut être notamment une amorce telle que décrite dans  
 20 l'exemple II.1 ci-après.

La présente invention a également pour objet :

(i) un réactif contenant une sonde de l'invention pour la détection  
 25 et/ou l'identification de la présence des souches pathogènes de *Neisseria* dans un échantillon biologique ;

(ii) un procédé de détection et/ou d'identification de la présence  
 des souches pathogènes de *Neisseria* dans un échantillon biologique ; ladite méthode comprenant les étapes consistant à a) extraire l'ADN ou l'ARN d'un  
 30 échantillon biologique et le dénaturer ; b) exposer ledit ADN ou ledit ARN à une sonde de l'invention, dans des conditions d'hybridation stringentes, de manière à détecter l'hybridation ; et

(iii) une méthode de détection et/ou d'identification des souches pathogènes de *Neisseria* dans un échantillon biologique dans lequel l'ADN est extrait d'un échantillon biologique et est mis en présence d'au moins une et de préférence de deux amorces de l'invention et est amplifié par exemple par PCR.

Comme mentionné précédemment, les polypeptides produits par l'expression des séquences ORF identifiées sont utiles comme agents vaccinaux. L'antigénicité spécifique des polypeptides homologues des polypeptides de séquences du groupe II peut être évaluée en testant la réactivité croisée avec un antisérum dirigé contre les polypeptides de séquences du groupe II. Un antisérum hyper-immun monospécifique peut être produit contre un polypeptide de séquence du groupe II purifié ou un polypeptide de fusion, par exemple un produit d'expression des systèmes MBP, GST, ou His-tag.

L'antigénicité spécifique peut être déterminée en utilisant diverses méthodes connues de l'homme du métier, en particulier les techniques de Western-Blot, Dot-Blot, et ELISA, décrites ci-dessous.

Dans la technique de Western-Blot, la préparation protéique à tester est soumise à une électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, le matériel est incubé avec un antisérum hyper-immun monospécifique obtenu après avoir immunisé un animal avec le matériel référent ; c'est-à-dire dans le cas présent, avec un polypeptide ayant une séquence d'acides aminés du groupe II. Cet antisérum est au préalable dilué dans un domaine de dilution allant d'environ 1:50 à 1:5000, de préférence d'environ 1:100 à 1:500. L'antigénicité spécifique est révélée lorsqu'une bande correspondant au produit présente une réactivité à l'une des dilutions ci-dessus.

Dans le test ELISA, on utilise de préférence une préparation protéique purifiée, bien qu'un extrait cellulaire entier puisse être également utilisé. Environ 100 µl d'une préparation à environ 10 µg/ml sont distribués dans les puits d'une plaque. La plaque est incubée pendant deux heures à 37°C puis une nuit à 4°C. La plaque est ensuite lavée avec une solution saline

de tampon phosphate (PBS) comprenant 0,05 % de Tween 20. Les puits sont saturés avec 250 µl de PBS contenant 1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) pour empêcher la liaison non spécifique d'anticorps. Après une heure d'incubation à 37°C, la plaque est lavée avec le tampon PBS/Tween.

5 L'antisérum est dilué en série dans du tampon PBS/Tween contenant 0,5 % BSA. 100 µl de cette dilution sont ajoutés par puits. La plaque est incubée pendant 90 minutes à 37°C, lavée et évaluée selon les procédures standard. Par exemple, lorsque des anticorps spécifiques sont produits chez des lapins, un conjugué peroxydase de chèvre anti-lapin est ajouté au puits. L'incubation

10 est réalisée pendant 90 minutes à 37°C et la plaque est ensuite lavée. La réaction est mesurée par colorimétrie (une réaction est positive lorsque la valeur de densité optique est de 1 si la dilution est d'au moins 1:50, de préférence d'au moins 1:500).

Dans le test Dot-Blot, on utilise de préférence une protéine

15 purifiée, étant entendu qu'il est également possible d'utiliser un extrait cellulaire entier. Une solution protéique à environ 100 µg/ml est diluée deux fois en série dans un tampon Tris-HCl 50mM, pH : 7,5. 100 µl de chaque dilution sont appliqués à une membrane de nitrocellulose (appareil BioRad). Le tampon est enlevé en appliquant du vide au système. Les puits sont lavés

20 par addition de 50 mM de tampon Tris-HCl (pH : 7,5) et la membrane est séchée à l'air. La membrane est ensuite saturée dans un tampon bloquant (50 mM Tris-HCl (pH : 7,5) 0,15M NaCl, 10 g/l de lait écrémé) et incubée avec une dilution d'antisérum allant d'environ 1:50 à 1:5000, de préférence à environ 1:500. La réaction est révélée conformément aux procédures standard. Par

25 exemple, lorsque des anticorps spécifiques sont produits chez des lapins, un conjugué peroxydase de chèvre anti-lapin est ajouté aux puits. L'incubation est réalisée pendant 90 minutes à 37°C. La réaction est développée avec le substrat approprié et mesurée, par exemple par colorimétrie, par l'apparition d'une tache colorée (une réaction est positive lorsqu'une tache colorée

30 apparaît en association avec une dilution d'au moins 1:50, de préférence d'au moins 1:500).

La présente invention a également pour objet (i) une composition pharmaceutique contenant une quantité thérapeutiquement ou prophylactiquement efficace d'un polypeptide de l'invention ; (ii) une méthode pour induire une réponse immune contre les souches pathogènes de *Neisseria* chez un vertébré, par administration audit vertébré d'une quantité immunogéniquement efficace d'un polypeptide de l'invention pour provoquer une réponse immune, en particulier une réponse immune protectrice contre les souches pathogènes de *Neisseria* ; et (iii) une méthode de prévention et/ou de traitement d'une infection par les souches pathogènes de *Neisseria*, par administration d'une quantité thérapeutique ou prophylactique d'un polypeptide de l'invention à un individu nécessitant un tel traitement.

Les compositions immunogènes de l'invention peuvent être administrées par n'importe quelle voie conventionnelle dans le domaine de la vaccination, en particulier par la voie parentérale (par exemple, sous-cutanée, intra-dermique, intra-musculaire, intraveineuse ou intra-péritonéale). Le choix de la voie d'administration dépend d'un certain nombre de paramètres tel que l'adjuvant associé au polypeptide.

Une composition de l'invention contient au moins un polypeptide tel que défini précédemment. Il peut également contenir au moins un antigène supplémentaire de *Neisseria meningitidis* et/ou *Neisseria gonorrhoeae*.

Les polypeptides de l'invention peuvent être formulés avec des liposomes, de préférence des liposomes neutres ou anioniques, des microsphères, des ISCOMS, des particules "virus-like" pour faciliter le transfert du polypeptide et/ou augmenter la réponse immune.

L'administration peut être réalisée par une dose unique ou par des doses répétées si nécessaire à des intervalles qui peuvent être déterminés par l'homme du métier.

Par exemple, une dose initiale peut être suivie de trois doses de rappel à des intervalles d'une ou plusieurs semaines ou d'un ou plusieurs mois. La dose appropriée dépend de nombreux paramètres incluant l'individu traité (adulte ou enfant), l'antigène vaccinal particulier, la voie d'administration et la fréquence d'administration, la présence ou l'absence ou encore le type

d'adjuvant, et l'effet désiré (par exemple, protection et/ou traitement) et peut être déterminée par l'homme du métier. Si la voie d'administration est parentérale, la dose est préférentiellement inférieure à 1 mg, de préférence d'environ 100 µg. Les polypeptides et polynucléotides de l'invention utilisés en tant qu'agents vaccinaux, peuvent être utilisés de manière séquentielle, dans un procédé d'immunisation en plusieurs étapes. Par exemple, un vertébré peut être initialement sensibilisé avec un vecteur vaccinal de l'invention, tel qu'un poxvirus, par exemple par la voie parentérale, puis être stimulé deux fois avec le polypeptide codé par le vecteur vaccinal.

Un polypeptide de l'invention peut également être utile comme agent de diagnostic pour détecter la présence d'anticorps anti-*Neisseria meningitidis* et/ou anti-*Neisseria gonorrhoeae* dans un échantillon biologique tel qu'un échantillon de sang.

La présente invention a également pour objet des anticorps monospécifiques dirigés contre les polypeptides de l'invention.

Par "anticorps monospécifique" on entend un anticorps capable de réagir de manière spécifique avec un polypeptide de *Neisseria* de l'invention. De tels anticorps peuvent être polyclonaux ou monoclonaux, et peuvent être des anticorps recombinants par exemple chimériques (par exemple, constitués par une région variable d'origine murine associée à une région constante d'origine humaine), humanisés et/ou à chaîne unique. Lesdits anticorps peuvent être également sous la forme de fragments

---

d'immunoglobuline par exemple de fragments F(ab)'<sub>2</sub> ou Fab. Les anticorps de l'invention peuvent être de n'importe quel isotype par exemple IgA ou IgG, les anticorps polyclonaux pouvant être d'un isotype unique ou pouvant contenir un mélange de plusieurs isotypes.

Les anticorps de l'invention dirigés contre les polypeptides de l'invention, peuvent être produits et identifiés en utilisant des méthodes immunologiques standard, par exemple l'analyse de Western-Blot, un essai Dot-Blot, un test ELISA (Coligan et al, Current Protocols in Immunology (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York, NY). Lesdits anticorps peuvent être utilisés dans des procédés de diagnostic pour détecter la présence d'un

antigène de *Neisseria meningitidis* dans un échantillon tel que notamment un échantillon biologique (par exemple du sang).

Les anticorps de l'invention peuvent également être utilisés dans des procédés de chromatographie par affinité pour purifier un polypeptide de l'invention. Enfin, de tels anticorps peuvent également être utilisés dans des méthodes d'immunisation passive prophylactique ou thérapeutique.

La présente invention a également pour objet une méthode de diagnostic pour la détection de la présence de souches pathogènes de *Neisseria* dans un échantillon biologique comprenant la mise en contact dudit échantillon biologique avec un anticorps, ou un polypeptide de l'invention, de telle sorte qu'un complexe immun soit formé, et la détection dudit complexe indicatrice de souches pathogènes de *Neisseria* dans l'organisme dont provient l'échantillon. L'homme du métier comprend que le complexe immun est formé entre un composant de l'échantillon et l'anticorps ou le polypeptide de l'invention, toute substance non liée pouvant être éliminée préalablement à la détection du complexe.

Ainsi, un réactif de type polypeptide peut être utilisé pour la détection de la présence d'anticorps anti-*Neisseria meningitidis* et/ou *Neisseria gonorrhoeae* dans un échantillon, tandis qu'un anticorps de l'invention peut être utilisé comme réactif pour tester la présence de polypeptide de *Neisseria meningitidis* et/ou *Neisseria gonorrhoeae* dans un échantillon.

Pour une utilisation dans des applications de diagnostic, le réactif (par exemple l'anticorps ou le polypeptide de l'invention) peut être à l'état libre ou immobilisé sur un support solide, par des moyens directs ou indirects.

Les moyens directs incluent l'adsorption passive ou la liaison covalente entre le support et le réactif.

Par moyen indirect, on entend qu'une substance qui interagit avec ledit réactif est fixée au support solide. Par exemple, si un réactif de type polypeptide est utilisé, un anticorps qui se lie à celui-ci peut servir de substance anti-réactif, étant entendu que celle-ci se lie à un anticorps qui n'est pas impliqué dans la reconnaissance des anticorps dans les échantillons biologiques.

Parmi les moyens indirects pouvant être utilisés, on peut également citer le système ligand récepteur, une molécule telle qu'une vitamine pouvant être greffée sur le réactif de type polypeptide et le récepteur correspondant pouvant être immobilisé sur la phase solide. Ceci est illustré  
5 par le système biotine-streptavidine. On peut également ajouter au réactif une queue peptidique par génie chimique ou génie génétique, et immobiliser le produit greffé ou fusionné par adsorption passive ou liaison covalente avec la queue peptidique.

La présente invention a également pour objet un procédé de  
10 purification, à partir d'un échantillon biologique, d'un polypeptide de *Neisseria* de l'invention, par chromatographie d'affinité avec un anticorps monospécifique de l'invention. Ledit anticorps est de préférence d'isotype IgG.

Selon un exemple de réalisation, un échantillon biologique, de préférence dans une solution tampon, est appliqué à un matériel  
15 chromatographique, de préférence équilibré avec le tampon utilisé pour diluer l'échantillon biologique, de telle sorte que le polypeptide de l'invention (c'est-à-dire l'antigène) puisse adsorber sur le matériel. Les composants non liés sont lavés et l'antigène est ensuite élué avec un tampon d'élution approprié, tel qu'un tampon Glycine ou un tampon contenant un agent chaotropique, par  
20 exemple la guanidine HCl, ou une forte concentration en sel (par exemple, 3 M MgCl<sub>2</sub>). Les fractions éluées sont recueillies et la présence d'antigène est détectée par exemple par mesure de l'absorbance à 280 nm.

---

La présente invention a également pour objet (i) une composition  
pharmaceutique contenant une quantité thérapeutiquement ou  
25 prophylactiquement efficace d'un anticorps monospécifique de l'invention ; et (ii) une méthode de prévention et/ou de traitement d'une infection par les souches pathogènes de *Neisseria*, par administration d'une quantité thérapeutique ou prophylactique d'un anticorps monospécifique de l'invention à un individu nécessitant un tel traitement.

30 A cette fin, l'anticorps monospécifique de l'invention est de préférence d'isotype IgG, et de préférence fixe le complément. Ledit anticorps monospécifique selon l'invention peut être administré seul ou en mélange avec

au moins un autre anticorps monospécifique, spécifique d'un polypeptide de *Neisseria meningitidis* et/ou *Neisseria gonorrhoeae* différent, selon l'invention. La quantité d'anticorps peut être déterminée facilement par l'homme du métier.

5 Par exemple, une administration quotidienne d'environ 100 à 1000 mg d'anticorps sur une semaine ou trois doses quotidiennes d'environ 100 à 1000 mg d'anticorps sur deux ou trois jours, peut être une posologie efficace.

L'efficacité thérapeutique ou prophylactique peut être évaluée en utilisant des méthodes standard connues de l'homme du métier, par exemple

10 en mesurant l'induction d'une réponse immune ou l'induction d'une immunité protectrice et/ou thérapeutique (chez des souris ou des rats nouveaux-nés), par évaluation de la charge bactérienne dans le liquide céphalo-rachidien. La protection peut être déterminée en comparant le degré d'infection de *Neisseria* à un groupe contrôle. La protection est mise en évidence lorsque l'infection est

15 réduite par comparaison au groupe contrôle. Une telle évaluation peut être faite avec les polynucléotides, les vecteurs vaccinaux, les polypeptides ainsi que les anticorps selon l'invention. L'efficacité thérapeutique ou prophylactique d'un produit selon l'invention (polynucléotide ou polypeptide) peut être aussi

20 évaluée en test de bactéricidie tel que décrit par Danve *et al.*, Vaccine (1993) 11 (12):1214, à l'encontre de la souche méningocoque d'origine du polynucléotide ou polypeptide utilisé. Dans le domaine des vaccins méningocoques, le test de bactéricidie est en effet reconnu comme étant le

---

test de référence à partir duquel on peut valablement prédire l'intérêt vaccinal d'un produit. En bref, on administre un produit selon l'invention à des animaux

25 tels que le lapin afin d'obtenir un antisérum à l'encontre de ce produit. Puis cet antisérum est testé pour sa capacité de lyse. Le titre de bactéricidie d'un antisérum représente l'inverse de la dilution de cet antisérum pour lequel 50 % de la charge en méningocoques est lysée. On considère que l'antisérum est bactéricide lorsque le titre est supérieur à 4 vis à vis de la souche

30 méningocoque d'origine du polynucléotide ou polypeptide utilisé. Dans ce cas-là, il est démontré que le produit à l'encontre duquel l'antisérum a été généré, est potentiellement intéressant d'un point de vue pharmaceutique.

Les exemples suivant illustrent l'invention sans en limiter la portée.

5

### **Légende de la figure**

La figure en annexe représente le vecteur pCAMyc-His utilisé comme vecteur de clonage.

10

### **Détails de la stratégie d'identification des ORF :**

Afin de sélectionner les séquences ORF spécifiques des souches pathogènes du genre *Neisseria*, une amplification par PCR est menée sur les séquences des 118 ORFs retenues après analyse par le logiciel Gene Jocke<sup>®</sup>, Codon Use<sup>®</sup>, et la recherche d'homologies. Seules les séquences pour lesquelles l'amplification chez *N. lactamica* est négative (séquences appelées "lactamica<sup>-</sup>") sont retenues. Afin de vérifier que ces résultats négatifs ne sont pas des "faux-négatifs", les séquences lactamica<sup>-</sup> retenues sont soumises à un dot blot.

20

### **A - Amplification par PCR :**

#### **A.1. Extraction des ADN génomiques :**

25

Les ADN génomiques de l'ensemble des souches de *Neisseria* utilisées dans cette étude ont été préparés selon un protocole identique. Les souches de *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. flava*, *N. subflava* et *N. mucosa* ont été cultivées sur boîte de milieu MHA (Muller Hinton Agar, Difco), les *N. gonorrhoeae* ont été cultivées sur boîte de milieu MHA supplémenté par 10% de sang cuit de cheval (Biomérieux) et 1% d'Isovitalex (Biomérieux). La culture se fait à 37°C pendant 18 h sous une atmosphère contenant 10% CO<sub>2</sub> une nuit à 37°C. Puis les cellules sont récoltées, lavées dans du tampon

30

phosphate PBS (pH 7.2) et l'ADN est extrait selon le protocole D du Kit " Rapid Prep genomic DNA isolation kit for cells and tissue " (Pharmacia Biotech).

Les ADN génomiques ont alors été contrôlés sur gel d'agarose pour leur intégrité et par réaction PCR pour leur pureté.

5

#### A.2. Réaction de PCR pour cribler les ORFs absentes dans *N. lactamica* 2314 :

10

Une amplification PCR a été réalisée sur les ADN génomiques de la souche *N. meningitidis* ATCC 13090 et *N. lactamica* 2314 (ATCC 23970) selon le protocole suivant :

La réaction de PCR a été réalisée sur un volume de 50 µl avec 10 ng d'ADN génomique, 250 µM de chacun des dNTPs, 300 nM de chacune des amorces, Tampon Taq DNA polymerase 1X, et 2 u de Taq DNA Polymerase (Appligène).

15

Les cycles d'amplification sont :

97°C	45 secondes	25 cycles
56°C	1 minute	25 cycles
72°C	2.30 minutes	25 cycles

20

Pour chacune des ORFs analysées, des contrôles positifs et négatifs de la réaction PCR ont été réalisés. A ce stade, seules les ORFs *N. meningitidis* + et *N. lactamica* - sont retenues.

25

#### B - Sélection des ORFs *N. meningitidis*<sup>+</sup> *N. lactamica*<sup>-</sup> par dot blot sur ADN génomique :

30

L'absence d'un produit d'amplification par PCR d'une ORF avec de l'ADN génomique de *N. lactamica* 2314 comme matrice, ne certifie pas l'absence de cette ORF dans le génome de *N. lactamica* 2314. En effet, une certaine variabilité dans la région où devraient s'hybrider les oligonucléotides peut être responsable de l'absence de produit amplifié pour une ORF donnée.

Dans ce contexte, une vérification supplémentaire est mise en oeuvre par dot blot sur ADN génomique en utilisant comme sonde les produits d'amplification génomique sur la souche de *N. meningitidis* correspondant à chacune des phases de lecture identifiées. Les filtres du dot blot contiennent

5 de l'ADN génomique des souches suivantes : 2 souches de *N. lactamica* 8064, 2314, une souche de *N. flava* ATCC 30008, une souche de *N. mucosa* ATCC 9297, 3 souches de *N. meningitidis* de séro groupe B ATCC13090, M982, B16B6, une souche de *N. meningitidis* de séro groupe A Z2491, une souche de

10 *N. meningitidis* de séro groupe C (souche Z4182), 2 souches de *N. gonorrhoeae* MS11 et FA1090. Cette analyse en dot blot permet de valider l'absence de l'ORF dans *N. lactamica* 2314 et 8064 et elle est aussi indicatrice du degré de variabilité d'une ORF au sein des souches de *Neisseria*.

La technique de dot blot utilisée est la suivante. Environ 50ng d'ADN génomique dénaturé 5 min à 100°C des différentes souches de

15 *Neisseria* sont déposés sous vide sur une membrane de nitrocellulose Hybond N+ (Amersham) placée entre les mâchoires d'un appareil à dot blot (Bio-Rad). Puis l'ADN est fixé sur les membranes 5 min à un rayonnement UV 315nm.

Les membranes sont incubées dans un tampon de pré-hybridation (contenant de l'ADN de sperme de saumon dénaturé). Elles sont

20 ensuite hybridées avec une sonde correspondant au produit d'amplification de l'ORF d'intérêt, marquée selon un protocole de marquage froid, comme le système 'DIG DNA labelling and detection kit' (Boehringer Mannheim).

---

L'ORF qui ne s'hybride pas sur l'ADN génomique de *N. lactamica* 2314 et 8064 est retenue définitivement comme candidat vaccinal potentiel.

## Exemple I : Clonage

### 1. Amplification par PCR

5                   Chacune des ORFs a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN génomique de *N. meningitidis* séro groupe B (souche ATCC 13090), selon un protocole standard.

Deux oligonucléotides, amorces du côté N-terminal et du côté C-Terminal ont été définis pour chacune des séquences ORF de l'invention.

10                   L'amorce du côté N-Terminal comprend un site de restriction enzymatique pour le clonage, une séquence Kozak CCACC pour l'initiation de la traduction (M. Kozak, J. Mol. Biol. **196** : 947-950), l'ATG de l'ORF potentielle et environ 17 bases spécifiques de la partie 5' de l'ORF.

15                   L'amorce du côté C-Terminal a été définie de manière à ce que l'ORF clonée soit en fusion dans sa partie 3' avec une répétition de 8 histidines et un codon stop présents dans le vecteur derrière le site multiple de clonage, d'où l'insertion d'une base "A" pour garder la bonne phase de lecture après le clonage et la disparition du codon stop de l'ORF. L'amorce du côté C-Terminal comprend ainsi un site de restriction enzymatique pour le  
20                   clonage, une base "A", puis environ 20 bases spécifiques de la partie 3' du gène à partir du codon précédent le codon stop.

Après recherche des sites de restriction absents chez chacune des ORFs à l'aide du sous-programme MapDraw de DNASTAR (Lasergene Software), les sites de restriction XbaI en 5' et BglII en 3' sont utilisés pour  
25                   l'ORF SEQ ID n°19. Pour l'ORF SEQ ID n°41, les sites SpeI en 5' et BglII en 3' sont utilisés. Les sites de restriction XbaI en 5' et BamHI en 3' sont utilisés pour cloner les ORFs restantes.

30                   Le mélange de PCR comprend pour un volume final de 100 µl, 10-50 ng ADN génomique, les amorces N-Terminale et C-Terminale à 200 nM chacun, les dNTPs à 250 µM chacun, le tampon PCR 1X (Composition du tampon PCR 10X : 200 mM Tris-HCl (pH8.8), 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM KCl,

100 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1% TritonX-100, 1mg/ml de sérumalbumine de bœuf exempte de nucléase) et 2,5 U de Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene).

L'amplification se fait comme suit :

5

Etape	Température (°C)	Temps (min.)	Nombre de cycles
Dénaturation	97	0.45	25
Hybridation	55-65	1	25
Elongation	72	1/kb ADN	25

10

Les amorces utilisées sont les suivantes :

---

N° ORF (référence interne)	SEQ ID n°	Amorce 5'	Amorce 3'
22	1-2	GCT CTA GAC CAC CAT GTC TGA AGA	CGG GAT CCA GAA ATG GCT GGA TTC
		AAA ATT GAA AAT GAG	GCT ATC AG
41	3-4	GCT CTA GAC CAC CAT GAA ACA CTT	CGG GAT CCA ATA CGT AGG ACT TGG
		ACT CAT CG	GTC
42-43	5-6	GCT CTA GAC CAC CAT GAA AAA ATC	CGG GAT CCA TTG CGG ATA AAC ATA
		CCT TTT CGT TC	TTC CGC C
47	7-8	GCT CTA GAC CAC CAT GCG AAC	CGG GAT CCA GAA CCG GTA GCC
		GAC CCC AAC CTT C	TAC GCC GAC
55	9-10	GCT CTA GAC CAC CAT GAA CAC ACG	CGG GAT CCA GCA ACG GCC TGC
		CAT CAT CGT TTC	CGC TTT AAG
68	11-12	GCT CTA GAC CAC CAT GCT GAC GTT	CGG GAT CCA CGG CAG AGG CAC
		TAT CGG ACT G	GAT TCC
71	13-14	GCT CTA GAC CAC CAT GGG CAT CCA	CGG GAT CCA CAA AAG TTC CAG AAA
		TCT CGA CTT C	ATC TAA CTC

N° ORF (référence interne)	SEQ ID n°	Amorce 5'	Amorce 3'
72	15-16	GCT CTA GAC CAC CAT GAA TAG ACC CAA GCA ACC	CGG GAT CCA TGC CGC TTG GGG GAG GC
73	17-18	GCT CTA GAC CAC CAT GAT GAA TGT CGA GGC AGA G	CGG GAT CCA CAG TTT GCC CGA CAT AC
74	19-20	GCT CTA GAC CAC CAT GAA ATT TTT TCC TGC TCC	GAA GAT CTA GAA ACT GTA ATT CAA GTT GAA G
98	21-22	GCT CTA GAC CAC CAT GAT TGA ATT TGT CCG AGC	CGG GAT CCA ACC CTG CGA CGA GTT GCC
116	23-24	GCT CTA GAC CAC CAT GCA ATA CAG CAC ACT GGC	CGG GAT CCA GTC CTT TTT CGC ACC TTG AAG
122	25-26	GCT CTA GAC CAC CAT GGA GCA GTC GGG CAA ATT C	CGG GAT CCA AGC TGT TTG GCG ATT TCG GTG

N° ORF (référence interne)	SEQ ID n°	Amorce 5'	Amorce 3'
125	27-28 GCT CTA CGG GGG AAA G	GAC CAC CAT GCA AAA CGG	CGG GAT CCA GTG CCT GCG CAG CTT GGA ATC
128	29-30 GCT CTA CAA TCT AAT GAT AAT G	GAC CAC CAT GAC ATT GCT	CGG GAT CCA TTC CGC AAA TAC CTG TTT CCA ACC
152	31-32 GCT CTA CGC CCG	GAC CAC CAT GAA ACA ATC	CGG GAT CCA TAC TTG GGC GCA ACA TGA C
153	33-34 GCT CTA CGG TTT CCC	GAC CAC CAT GAA TGT TTA	CGG GAT CCA TTT TTT AGA CGT ATT TTT AGT CG
155	35-36 GCT CTA ACA CTC TGC C	GAC CAC CAT GAT GAG TCA	CGG GAT CCA TCC AGT TTT TGC TCG AAG GC
156	37-38 GCT CTA CAA AAA CTG G	GAC CAC CAT GCC TTC GAG	CGG GAT CCA TCG TTC TTC AAT CTC CAC AAA CG
157	39-40 GCT CTA TGG AAA G	GAC CAC CAT GCA CCT ATG	CGG GAT CCA TTC AAT TCG CTT CAA CAA TG

N° ORF (référence interne)	SEQ ID n°	Amorce 5'	Amorce 3'
158	41-42	GGA CTA GTC CAC CAT GGC TGC CAA	GAA GAT CTA AGC CGC GTT CCC TTC
		CCA ACG TTA CCG	CAA AAA ATC
159	43-44	GCT CTA GAC CAC CAT GCC GCA AAT	CGG GAT CCA AAA ACA ATC TTC CGG
		TAA AAT TCC C	CAC CC
161	45-46	GCT CTA GAC CAC CAT GCG CAC GCC	CGG GAT CCA TTG GGC AAC GAC GAA
		GTT TTG TTG	GGC AC
163-1	47-48	GCT CTA GAC CAC CAT GAG AAT AGA	CGG GAT CCA TGG CTC AAT CCT TTC
		GAT CAC ACC	TGC
163-2	49-50	GCT CTA GAC CAC CAT GAT TCA CGT	CGG GAT CCA ACC TGC TTC ATG GGT
		TTC GGC AGT G	GAT TC
167-168	51-52	GCT CTA GAC CAC CAT GAA TTC GAC	CGG GAT CCA AAT CCC TCT GCC GTA
		CGC AAG TAA AAC	TTT G

## 2 - Clonage, transformation et sélection des recombinants

Le vecteur de clonage utilisé est le vecteur pCA/Myc-His ou pM1070 de 6.357 kb (cf figure), issu du plasmide pCDNA 3.1 (Invitrogen). Le pCA/Myc-His comprend notamment le promoteur ie1 de CMV (bases 249-902), l'intron A du gène ie1 de CMV (Chapman et al., 1991 Nucleic Acids Research, 19, 3979-3986), un site multiple de clonage (bases 1792-1852) avec les sites PmlI, EcoRV, NotI, XbaI, BamHI, KpnI et HindIII, une séquence codant pour une polyhistidine et un codon stop (bases 1908-1928), une séquence de terminaison 3'bgh (bases 1853-2197) et le gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des clones recombinants dans *E. coli*.

Après purification (Kit GeneClean Bio101), les produits d'amplification PCR sont digérés 2 heures à 37°C par les enzymes adéquates (XbaI-BamHI, XbaI-BglII, ou SpeI-BglII) dans un volume réactionnel final de 20 µl. Les produits de digestion sont alors ligués avec le vecteur pCA/Myc-His préalablement digéré par XbaI et BamHI selon le protocole de "Rapid DNA Ligation Kit" (Boehringer Mannheim). 15 µl de la ligation est utilisé pour transformer 100 µl de cellules compétentes *E. coli* XLI-blue (Novagen). Les cellules sont incubées 30 minutes dans la glace, 30 secondes à 42°C et 2 minutes dans la glace. Puis on ajoute 500 µl de milieu LB sans antibiotique et on incube 1 heure à 37°C. Ensuite 50 et 550 µl de la culture sont étalés sur des boîtes de milieu LB plus ampicilline (50 µg/ml concentration finale) et incubés une nuit à 37°C.

Le lendemain 36 colonies sont mises en culture dans 2 ml de LB plus ampicilline (50 µg/ml) et incubées une nuit à 37°C.

Le lendemain l'ADN plasmidique est extrait selon le protocole Qiagen mini-prep (Qiagen) et les recombinants sont identifiés par restriction enzymatique suivi d'une électrophorèse sur gel d'agarose. Les jonctions de clonage sont ensuite vérifiées par séquençage.

## Exemple II : Evaluation de l'activité protectrice des ORF de l'invention

### 5                    A. Préparation de l'ADN destiné aux expériences d'immunisations :

Une colonie isolée d'un clone recombinant est utilisée pour inoculer une préculture en milieu LB+ ampicilline et 5 ml de cette préculture représente l'inoculat d'une culture de 2,5 litres en milieu LB+ ampicilline. Le  
10                    protocole de purification pour préparer l'ADN plasmidique est celui décrit dans le Kit EndoFree Giga (Qiagen). L'ADN purifié est élué de la colonne de purification avec un tampon Tris-HCl 10 mM EDTA 1 mM pH 8 et conservé à – 20°C. Avant l'injection, le plasmide recombinant purifié est dilué à raison de  
15                    100 µg/ml avec de l'eau (de qualité pour préparation injectable) et la concentration en NaCl est amenée à 150 mM.

### B. Production d'un sérum polyclonal spécifique :

#### 20                    B. 1. Hyperimmunisation dans un modèle animal :

Le modèle animal utilisé est la souris ou le lapin. La voie d'administration de l'ADN injecté est la voie intramusculaire ou la voie  
intradermique. Les plasmides recombinants à injecter sont éventuellement appliqués sur des billes s'ils sont injectés chez l'animal avec un appareil gene  
25                    gun (BioRad). Le protocole d'immunisation suit un schéma comportant deux injections à 3 semaines d'intervalles.

#### B.2. Analyse de l'activité bactéricide des anticorps induits :

Dix jours après la dernière injection, les animaux sont saignés et  
30                    les sera sont analysés avec le test de bactéricidie selon le protocole de Danve *et al.*, Vaccine (1993) 11 (12):1214. Brièvement, les sera sont incubés à différentes dilutions (raison 2) en présence de complément de lapin et de

méningococoques cultivés en présence ou en absence d'un agent chélatant du fer. Le titre de bactéricidie d'un sérum représente l'inverse de la dilution de cet antisérum pour lequel 50% des bactéries sont lysées.

On considère que l'antisérum n'est pas bactéricide lorsque son titre est inférieur à 4 contre la souche homologue.

Quand le titre de bactéricidie correspond à une séroconversion d'un facteur 4 contre la souche homologue, l'activité bactéricide de l'antisérum est analysée vis-à-vis des autres souches de *Neisseria* pour mesurer l'étendue de la réactivité croisée de l'antisérum d'intérêt.

### Exemple III : Production de protéines recombinantes purifiées

#### 1. Production recombinante de protéines

##### a. Préparation des transformants :

Le produit de PCR obtenu est ensuite digéré à 37°C pendant deux heures avec des enzymes de restriction dans 20 µl de volume réactionnel. Le produit de digestion est ligaturé dans un plasmide pET28a (Novagen), clivé de manière similaire, qui est déphosphorylé avant la ligature par traitement avec la phosphatase alcaline intestinale de veau. Le gène de fusion construit de cette manière permet la purification par affinité en une étape de la protéine de fusion résultante en raison de la présence de résidus histidine à l'extrémité N-terminale de la protéine de fusion qui sont codés par ce vecteur.

La réaction de ligature (20 µl) est effectuée à 14°C une nuit, avant transformation de 100 µl de cellules compétentes fraîches *E. coli* XL1-blue (Novagen). Les cellules sont incubées sur de la glace pendant deux heures puis soumises à un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes avant d'être remises dans la glace pendant 90 secondes. Les échantillons sont ensuite ajoutés à 1 ml de bouillon LB en l'absence de sélection et cultivés à

37°C pendant deux heures. Les cellules sont ensuite étalées sur du milieu gélosé LB additionné de kanamycine (50 µg/ml de concentration finale) à une dilution 10x, et sont incubées une nuit à 37°C. Le jour suivant, 50 colonies sont repiquées sur des boîtes secondaires et sont incubées à 37°C une nuit.

5

#### b. Production de la protéine :

Les transformants stockés (10 µl) sont étalés sur des boîtes de sélection et cultivés une nuit à 37°C. Quelques cellules sont recueillies à partir de la boîte utilisée comme inoculum pour une culture starter une nuit (3 ml) à 37°C. Le jour suivant, un échantillon (temps T=0) est recueilli et centrifugé à 14 000 tpm pendant 3 minutes. La culture starter est ensuite utilisée pour inoculer un milieu LB contenant de la kanamycine (100 µg/ml) à une dilution de 1:50 (densité optique de départ DO<sub>600</sub> = 0,05-0,1). Les cellules sont cultivées à une DO<sub>600</sub> de 1,0, un échantillon est recueilli pour une SDS-PAGE (échantillon de pré-induction) et la culture restante est induite avec 1 mM d'IPTG. Les cultures sont cultivées pendant quatre heures et des échantillons sont prélevés toutes les heures. La culture est centrifugée à 600 x g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est écarté et les culots sont resuspendus dans 50 mM de Tris-HCl (pH : 8,0), 2 mM EDTA, et recentrifugé. Le surnageant est écarté et les cellules sont stockées à -70°C.

20

## 2. Purification des protéines

Les culots obtenus à partir d'un litre de culture préparé selon l'exemple 1.4 précédent sont séchés et resuspendus dans 20 ml de 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 5 mM Imidazole, refroidis dans la glace. Du lysozyme est ajoutée à une concentration de 0,1 mg/ml et la suspension est homogénéisée en utilisant un homogénéiseur à haute vitesse (Turrax) puis traitée avec un sonicateur (Branson, Sonofier 450). De la Benzonase (Merck) est utilisée à une concentration finale de 1 U/ml pour éliminer l'ADN. La suspension est centrifugée à 40 000 x g pendant 20 minutes et le surnageant est filtré à travers une membrane de 0,45 µm. Le surnageant est chargé sur une colonne IMAC (12 ml de résine) qui a été préparée en immobilisant des

25

30

cations  $\text{Ni}^{++}$  selon les recommandations du fabricant (Pharmacia). La colonne est lavée avec 10 volumes de colonnes de 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M NaCl, 60 mM Imidazole. La protéine recombinante est éluée avec six volumes de 20 mM Tris-HCl (pH : 7.9), 0.5 M NaCl, 500 mM Imidazole, 0.1% Zwittergent 3-14.

Le profil d'élution est contrôlé en mesurant l'absorbance des fractions à une densité optique de 280 nm. Une fraction aliquote est analysée sur un gel SDS-PAGE et colorée avec du bleu de Coomassie (Phast System – Pharmacia), et les fractions correspondant au pic de protéine sont ensuite regroupées et concentrées. Pour éliminer le tampon d'élution, la fraction est passée sur une colonne G24 Sephadex (Pharmacia), équilibrée dans du tampon PBS (pH : 7,4). La solution protéique est stérilisée par filtration à travers une membrane de 0,45  $\mu\text{m}$ , et la concentration protéique est déterminée par la microméthode BCA (Pierce). La solution protéique est stockée à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### Exemple IV : Production d'anticorps polyclonaux monospécifiques

##### **1. Antisérum hyperimmun de lapin**

~~On injecte à des lapins de Nouvelle Zélande à la fois par voie~~  
cutanée et par voie intraveineuse 100  $\mu\text{g}$  (au total) du polypeptide purifié à l'exemple III, en présence d'adjuvant complet de Freund dans un volume total d'approximativement 2 ml. 21 et 42 jours après l'injection initiale, les doses de rappel qui sont identiques aux doses initiales, sont administrées de la même manière, à l'exception du fait que de l'adjuvant incomplet de Freund est utilisé. 15 jours après la dernière injection, le sérum de l'animal est recueilli, décomplémenté, et filtré à travers une membrane de 0,45  $\mu\text{m}$ .

## 2. Liquide d'ascites hyperimmun de souris

On injecte à 10 souris par voie sous-cutanée 10-50 µg du polypeptide de fusion purifié obtenu à l'exemple II, en présence d'adjuvant complet de Freund, dans un volume d'approximativement 200 µl. 7 et 14 jours après l'injection initiale, des doses de rappel, qui sont identiques aux doses initiales, sont administrées de la même manière, à l'exception du fait que de l'adjuvant incomplet de Freund est utilisé. 21 et 28 jours après l'injection initiale, les souris reçoivent 50 µg de l'antigène seul par voie intrapéritonéale. Au 21<sup>ème</sup> jour, on injecte également aux souris par voie intrapéritonéale, les cellules 180/TG CM26684 de sarcome (Lennette & Schmidt, Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections, (1979) 5th Ed. Washington DC, American Public Health Association). Les liquides d'ascites sont recueillis 10 à 13 jours après la première injection.

## Exemple V : Purification des polypeptides de l'invention par immunoaffinité

### 1. Purification d'IgG spécifique

Un sérum immun tel que préparé à l'exemple IV est appliqué à une colonne de protéine A Sépharose 4 Fast Flow (Pharmacia) équilibrée avec 100 mM Tris-HCl (pH: 8,0). La résine est lavée en appliquant 10 volumes de colonnes de 100 mM Tris-HCl et 10 volumes de 10 mM Tris-HCl (pH : 8,0) à la colonne. Les IgG sont éluées avec un tampon glycine de 0,1 M (pH : 3,0) et sont recueillies par fraction de 5 ml auxquelles on ajoute 0,25 ml de Tris-HCl 1 M (pH : 8,0). La densité optique de l'éluat est mesurée à 280 nm et les fractions contenant les IgG sont regroupées et si nécessaire stockées à -70°C.

### 2. Préparation de la colonne

Une quantité appropriée de gel Sépharose 4B activé par CNBr (1 g de gel séché fournissant approximativement 3,5 ml de gel hydraté, et la

capacité du gel allant de 5 à 10 mg d'IgG couplée par ml de gel) fabriqué par Pharmacia (17-0430-01) et suspendue dans un tampon HCl de 1 mM et lavée avec un buchner par addition de petites quantités de tampon HCl 1 mM. Le volume total du tampon est de 200 ml par gramme de gel.

5 Les IgG purifiées sont dialysées pendant quatre heures à  $20 \pm 5^\circ\text{C}$  contre 5 volumes de tampon PBS de 500 mM (pH : 7,5). Puis elles sont diluées dans 500 mM de PBS (pH : 7,5) pour une concentration finale de 3 mg/ml.

10 Les IgG sont incubées avec le gel une nuit à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ , sous agitation. Le gel est tassé dans une colonne de chromatographie et lavé avec 2 volumes de colonne de tampon phosphate, 500 mM (pH : 7,5) puis un volume de tampon sodium 50 mM NaCl (pH : 7,5). Le gel est ensuite transféré dans un tube puis incubé avec 100 mM d'éthanolamine, (pH : 7,5) pendant 4 heures à température ambiante sous agitation, puis lavé deux fois avec deux  
15 volumes de colonnes de PBS. Le gel est ensuite stocké dans du PBS merthiolate à 1/10 000. La quantité d'IgG couplé au gel est déterminée en mesurant la densité optique à 280 nm de la solution d'IgG et de l'éluat direct.

### 3. Adsorption et élution de l'antigène.

20 Une solution d'antigène dans 50 mM Tris-HCl (pH : 8,0), 2 mM EDTA, par exemple, le surnageant obtenu à l'exemple III.5 après traitement par la Benzonase, centrifugation et filtration à travers une membrane de 0,45  $\mu\text{m}$ , est appliquée à une colonne équilibrée avec 50 mM Tris-HCl (pH : 8,0), 2 mM EDTA à une vitesse de flux d'environ 10 ml/heure. Puis, la colonne est  
25 lavée avec 20 volumes de 50 mM Tris-HCl (pH : 8,0), 2 mM EDTA. De manière alternative, l'adsorption peut être réalisée en " batch " qui est laissé une nuit à  $5 \pm 3^\circ\text{C}$ , sous agitation.

30 Le gel est lavé avec 2 à 6 volumes de tampon PBS 10 mM (pH : 6,8). L'antigène est élué avec un tampon glycine 100 mM (pH : 2,5). L'éluat est recueilli dans des fractions de 3 ml auquel on ajoute 150  $\mu\text{l}$  de tampon PBS 1 mM (pH : 8,0). La densité optique est mesurée à 280 nm pour chaque fraction ; celles contenant l'antigène sont recueillies et stockées à  $-20^\circ\text{C}$ .

-SEQ ID n°2

-SEQ ID n°1

```

1/1
ATG TCT GAA GAA AAA TTG AAA ATG AGT TTC GAG CCA ACC GTA ATC GAA CAT TTG GGT GTA
Met ser glu glu lys leu lys met ser phe glu pro thr val ile glu his leu gly val
61/21
AAG ATG TAT TCG CAC ACT GTT CCT GCG ATT GCC GAG TTG ATA GCG AAT GCC TAC GAT GCA
lys met tyr ser his thr val pro ala ile ala glu leu ile ala asn ala tyr asp ala
121/41
TGT GCT ACG GAA GTG GAA GTT AGG TTA TTC GAT AAA CCG GAG CAT AAA ATC GTT ATC AAA
cys ala thr glu val glu val arg leu phe asp lys pro glu his lys ile val ile lys
181/61
GAT AAT GGT ATA GGA ATG AGC TTC GAT GAA ATC AAT GAT TTT TAT TTG AGA ATC GGT CGG
asp asn gly ile gly met ser phe asp glu ile asn asp phe tyr leu arg ile gly arg
241/81
AAC AGA AGG GAA GAA AAA CAA GCT TCC CCG TGC GGA AGA ATT CCA ACG GGT AAA AAA GGC
asn arg arg glu glu lys gln ala ser pro cys gly arg ile pro thr gly lys lys gly
301/101
CTT GGT AAA TTG GCA TTA TTC GGG CTT GGC AAC AAA ATT GAA ATT TCT ACT ATC CAG GGA
leu gly lys leu ala leu phe gly leu gly asn lys ile glu ile ser thr ile gln gly
361/121
AAC GAA AGG GTT ACT TTT ACT TTG GAT TAT GCA GAG ATT CGA AGA AGC AAG GGT ATT TAT
asn glu arg val thr phe thr leu asp tyr ala glu ile arg arg ser lys gly ile tyr
421/141
CAA CCG GAG TTT CGA AAA GAA TCT GTT GAA TCC AAT ATC GAA AGC GGG ACA ACC ATA ACT
gln pro glu phe arg lys glu ser val glu ser asn ile glu ser gly thr thr ile thr
481/161
TTA ACC GAA CTG ACG AAA AAG CAA GGA TAT CCG TTA GAT AAT TAT GTA GAG CAT CTT TCC
leu thr glu leu thr lys lys gln gly tyr pro leu asp asn tyr val glu his leu ser
541/181
CGC TTG TTT GAT TTT CCG GCT CAG GAT TTT AAA ATC AAA GTA AGC TTG AAC GGC TCT GAA
arg leu phe asp phe pro ala gln asp phe lys ile lys val ser leu asn gly ser glu
601/201
CCT AAA ATC ATT GAT GGA AAT CTA AAA TAT GAT CTT GTT ACC CCA CAA TTC GAA TGG GAA
pro lys ile ile asp gly asn leu lys tyr asp leu val thr pro gln phe glu trp glu
661/221
TAC CAG GAT TTA GCA ACC AAT ATT TCA TCG TTA TCT TCA AAA TTC GAA CAG TAT GAA TAC
tyr gln asp leu ala thr asn ile ser ser leu ser ser lys phe glu gln tyr glu tyr
721/241
AGC GGA TTA ATA CAA GGT AAG TTC ATT ACA ACG GAA AAA CCT TTA AAG AAT AAT ATG AAA
ser gly leu ile gln gly lys phe ile thr thr glu lys pro leu lys asn asn met lys
781/261
GGT ATT ACC TTG TTT GCC AAC GGC AGA ATG GTA AAT ATG CCC GAG TTT TTC ACT GAT AGC
gly ile thr leu phe ala asn gly arg met val asn met pro glu phe phe thr asp ser
841/281
GAA TCC AGC CAT TTC TAA
glu ser ser his phe OCH

```

SEQ ID n°4

SEQ ID n°3

```

1/1
ATG AAA CAC TTA CTC ATC GAT TTT GAA AAC GTC CAG CCG CAA AAC TTA GAC AAA TTA CTA
Met lys his leu leu ile asp phe glu asn val gln pro gln asn leu asp lys leu leu
61/21
ACC GAA AAT ACC CAT ATT TGG CTA TTT ATA GGT GTA TTA CAC AAA ATG TTA CCT ATT AGT
thr glu asn thr his ile trp leu phe ile gly val leu his lys met leu pro ile ser
121/41
CTG GTG CAA TCC CTA CTA CGT TTC GGC GAA CGT GTC CAT CTT GTC CAG TTA CAA AAA ACG
leu val gln ser leu leu arg phe gly glu arg val his leu val gln leu gln lys thr
181/61
GGG AAA AAC GCA TTG GAT TTT TAC CTG TCC TAT TAC CTC GGA CAA ATT ACC GCC ACA GAC
gly lys asn ala leu asp phe tyr leu ser tyr tyr leu gly gln ile thr ala thr asp
241/81
CCC AAT GCC CAA ATC GGC ATA CTC TCG CGT GAT GGA GGA TAC GAT GTT CTG GTC GAA CAT
pro asn ala gln ile gly ile leu ser arg asp gly gly tyr asp val leu val glu his
301/101
ATT TTG AAA AAC CAC CAG GCG AAG GGT ATC GTG CGC CTA GCC AAT ATA GAT GAA GTA CAA
ile leu lys asn his gln ala lys gly ile val arg leu ala asn ile asp glu val gln
361/121
CAT CAG AAA ATT GCT ACC GAA CCG CCG TCA GCA TTG CTG GAA AAC ACT CCT CAG CCT GAA
his gln lys ile ala thr glu pro pro ser ala leu leu glu asn thr pro gln pro glu
421/141
ACC ACC CTC AAA CCA CAG CAA CCA TTA ACT TCC TAT TTC CAA GCA GCC CTA ACT GCA CTG
thr thr leu lys pro gln gln pro leu thr ser tyr phe gln ala ala leu thr ala leu
481/161
CGC CGC CCC GAC GCT TTC CGC CCC TGC CGC CTG CAT AAC CTG CGA CAA AAT CTG CGT AAG
arg arg pro asp ala phe arg pro cys arg leu his asn leu arg gln asn leu arg lys
541/181
CAT ATT TTG AGT GAT TTG TTT AAA GAA AAA ACC GAT GAA GAA TGC GAA ATA ACC ACT GCT
his ile leu ser asp leu phe lys glu lys thr asp glu glu cys glu ile thr thr ala
601/201
AAC GTT ATC AAT AAA CTC AAA GCA CAA AAC TTC ATC AGC ATT GAT GAA CAG GAA ACC GTT
asn val ile asn lys leu lys ala gln asn phe ile ser ile asp glu gln glu thr val
661/221
TCC TAC CAT CTC AGT GAT AAT GAT TTG TTA CAA AGA ATC CAA CGC CAT ATT TTA AGC CAA
ser tyr his leu ser asp asn asp leu leu gln arg ile gln arg his ile leu ser gln
721/241
CGT CCC AAA ACC TAC GCT GAT TTT CAA GCC GTC GTG CAA AAC CGA GCA GAT GCA CTT CAC
arg pro lys thr tyr ala asp phe gln ala val val gln asn arg ala asp ala leu his
781/261
TTA ACA GTC GGT ACC AAC GAC ATT CAA TCC TTT GCG CGA CAT TTG CGC GAC CAA AAC CTG
leu thr val gly thr asn asp ile gln ser phe ala arg his leu arg asp gln asn leu
841/281
ATC CGC CAA AAC AAT GGG AAA ATT GAA TAT GCA CCG TTT ACT GAA CCT AAA CCA CAG CCA
ile arg gln asn asn gly lys ile glu tyr ala pro phe thr glu pro lys pro gln pro
901/301
ACG CCC AAG CAG CCT AAA AAA ACC GCA TGG GAA CCT GAT GAA ATT ATT TGG AAA AAA GTG
thr pro lys gln pro lys lys thr ala trp glu pro asp glu ile ile trp lys lys val
961/321
ATT GCC GCG TTA TCG TTA AAG AAC CGT CCT AAT AAA ACC AAA ACT TTA CGC AAT ACA ATC
ile ala ala leu ser leu lys asn arg pro asn lys thr lys thr leu arg asn thr ile
1021/341
CAG GCA CTC ACA AAA TCC AAT GCA CAA GAA ACT GAC AAA CTG CTA CAA CAT TTA CAA GAT
gln ala leu thr lys ser asn ala gln glu thr asp lys leu leu gln his leu gln asp
1081/361
GAC CCA AGT CCT ACG TAT TGA
asp pro ser pro thr tyr OPA

```

SEQ ID n°6

SEQ ID n°5

1/1	31/11
ATG AAA AAA TCC CTT TTC GTT CTC TTT CTG	TAT TCA TCC CTA CTT ACC GCC AGC GAA ATC
Met lys lys ser leu phe val leu phe leu	tyr ser ser leu leu thr ala ser glu ile
61/21	91/31
GCC TAT CGC TTT GTA TTC GGA ATT GAA ACC	TTA CCG GCT GCA AAA ATG GCA GAA ACG TTT
ala tyr arg phe val phe gly ile glu thr	leu pro ala ala lys met ala glu thr phe
121/41	151/51
GCG CTG ACA TTT ATG ATT GCT GCG CTG TAT	CTG TTT GCG CGT TAT AAG GCT TCG CGG CTG
ala leu thr phe met ile ala ala leu tyr	leu phe ala arg tyr lys ala ser arg leu
181/61	211/71
CTG ATT GCG GTG TTT TTC GCG TTC AGC ATT	ATT GCC AAC AAT GTA CAT TAT GCG GTT TAT
leu ile ala val phe phe ala phe ser ile	ile ala asn asn val his tyr ala val tyr
241/81	271/91
CAA AGT TGG ATG ACG GGC ATC AAT TAT TGG	CTG ATG CTG AAA GAG ATT ACC GAA GTC GGC
gln ser trp met thr gly ile asn tyr trp	leu met leu lys glu ile thr glu val gly
301/101	331/111
AGT GCG GGC GCG TCG ATG TTG GAT AAG TTG	TGG CTG CCT GCG TTG TGG GGC GTG TTG GAA
ser ala gly ala ser met leu asp lys leu	trp leu pro ala leu trp gly val leu glu
361/121	391/131
GTC ATG TTG TTT TGC AGC CTT GCC AAG TTC	CAC CGT AAG ACG CAT TTT TCT GCC GAT ATA
val met leu phe cys ser leu ala lys phe	his arg lys thr his phe ser ala asp ile
421/141	451/151
CTG TTT GCC TTC CTA ATG CTG ATG ATT TTC	GTG CGT TCG TTC GAC ACG AAA CAA GAG CAC
leu phe ala phe leu met leu met ile phe	val arg ser phe asp thr lys gln glu his
481/161	511/171
GGT ATT TCG CCC AAA CCG ACA TAC AGC CGC	ATC AAA GCC AAT TAT TTC AGC TTC GGT TAT
gly ile ser pro lys pro thr tyr ser arg	ile lys ala asn tyr phe ser phe gly tyr
541/181	571/191
TTT GTC GGA CGC GTG TTG CCG TAT CAG TTG	TTT GAT TTA AGC AGG ATT CCC GCC TTT AAG
phe val gly arg val leu pro tyr gln leu	phe asp leu ser arg ile pro ala phe lys
601/201	631/211
CAG CCT GCT CCA AGC AAA ATC GGG CAG GGC	AGT GTT CAA AAT ATC GTC CTG ATT ATG GGC
gln pro ala pro ser lys ile gly gln gly	ser val gln asn ile val leu ile met gly
661/221	691/231
GAA AGC GAA AGC GCG GCG CAT TTG AAG CTG	TTT GGC TAC GGA CGC GAA ACT TCG CCG TTT
glu ser glu ser ala ala his leu lys leu	phe gly tyr gly arg glu thr ser pro phe
721/241	751/251
TTA ACC CGG CTG TCG CAA GCC GAT TTT AAG	CCG ATT GTG AAA CAA AGT TAT TCC GCA GGC
leu thr arg leu ser gln ala asp phe lys	pro ile val lys gln ser tyr ser ala gly
781/261	811/271
TTT ATG ACT GCA GTG TCC CTG CCC AGT TTT	TTC AAT GCG ATA CCG CAC GCC AAC GGC TTG
phe met thr ala val ser leu pro ser phe	phe asn ala ile pro his ala asn gly leu
841/281	871/291
GAA CAA ATC AGC GGC GGC GAT ACT AAT ATG	TTC CGC CTC GCC AAA GAG CAG GGC TAT GAA
glu gln ile ser gly gly asp thr asn met	phe arg leu ala lys glu gln gly tyr glu
901/301	931/311
ACG TAT TTT TAC AGC GCA CAG GCG GAA AAC	GAG ATG GCG ATT TTG AAC TTA ATC GGT AAG
thr tyr phe tyr ser ala gln ala glu asn	glu met ala ile leu asn leu ile gly lys
961/321	991/331
AAA TGG ATA GAC CAT CTG ATT CAG CCG ACG	CAG CTT GGC TAC GGC AAC GGC GAC AAT ATG
lys trp ile asp his leu ile gln pro thr	gln leu gly tyr gly asn gly asp asn met
1021/341	1051/351
CCC GAT GAG AAG CTG CTG CCG CTG TTC GAC	AAA ATC AAT TTG CAG CAG GGC AGG CAT TTT
pro asp glu lys leu leu pro leu phe asp	lys ile asn leu gln gln gly arg his phe
1081/361	1111/371
ATC GTG TTG CAC CAA CGT GGT TCG CAC GCC	CCA TAC AGC GCA TTG TTG CAG CCT CAA GAT
ile val leu his gln arg gly ser his ala	pro tyr ser ala leu leu gln pro gln asp
1141/381	1171/391
AAA GTA TTC GGC GAA CTT ATT GTG GAT AAG	TAC GAC AAC ACC ATC CAC AAA ACC GAC CAA
lys val phe gly glu leu ile val asp lys	tyr asp asn thr ile his lys thr asp gln

1201/401	1231/411
ATG ATT CAA ACC GTA TTC GAG CAG CTG CAA	AAG CAG CCT GAC GGC AAC TGG CTG TTT GCC
met ile gln thr val phe glu gln leu gln	lys gln pro asp gly asn trp leu phe ala
1261/421	1291/431
TAT ACC TCC GAT CAT GGC CAG TAT GTT CGC	CAA GAT ATC TAC AAT CAA GGC ACG GTG CAG
tyr thr ser asp his gly gln tyr val arg	gln asp ile tyr asn gln gly thr val gln
1321/441	1351/451
CCC GAC AGC TAT CTC GTG CCG CTG GTG TTG	TAC AGC TCG AAT AAG GCC GTG CAA CAG GCT
pro asp ser tyr leu val pro leu val leu	tyr ser ser asn lys ala val gln gln ala
1381/461	1411/471
GCC AAC CAG GCT TTT GCG CCT TGC GAG ATT	GCC TTC CAT CAG CAG CTT TCA ACG TTC CTG
ala asn gln ala phe ala pro cys glu ile	ala phe his gln gln leu ser thr phe leu
1441/481	1471/491
ATT CAC ACG TTG GGC TAC GAT ATG CCG GTT	TCA GGT TGT CGC GAA GGC TCG GTA ACG GGC
ile his thr leu gly tyr asp met pro val	ser gly cys arg glu gly ser val thr gly
1501/501	1531/511
AAC CTG ATT ACG GGT GAT GCA GGC AGC TTG	AAC ATT CGC GAC GGC AAG GCG GAA TAT GTT
asn leu ile thr gly asp ala gly ser leu	asn ile arg asp gly lys ala glu tyr val
1561/521	
TAT CCG CAA TGA	
tyr pro gln OPA	

---

SEQ ID n°8

SEQ ID n°7

1/1	31/11
ATG CGA ACG ACC CCA ACC TTC CCT ACA AAA	ACT TTC AAA CCG GCT GCC ATG GCG TTA GCT
Met arg thr thr pro thr phe pro thr lys	thr phe lys pro ala ala met ala leu ala
61/21	91/31
GTT GCA ACA ACA CTT TCT GCC TGC TTA GGC	GGC GGC GGC GGC ACT TCT GCG CCC GAC TTC
val ala thr thr leu ser ala	cys leu gly gly gly gly gly thr ser ala pro asp phe
121/41	151/51
AAT GCA GGC GGC ACC GGT ATC GGC AGC AAC	AGC AGA GCA ACA ACA GCG AAA TCA GCA GCA
asn ala gly gly thr gly ile gly ser asn	ser arg ala thr thr ala lys ser ala ala
181/61	211/71
GTA TCT TAC GCC GGT ATC AAG AAC GAA ATG	TGC AAA GAC AGA AGC ATG CTC TGT GCC GGT
val ser tyr ala gly ile lys asn glu met	cys lys asp arg ser met leu cys ala gly
241/81	271/91
CGG GAT GAC GTT GCG GTT ACA GAC AGG GAT	GCC AAA ATC AAT GCC CCC CCC CCG AAT CTG
arg asp val ala val thr asp arg asp	ala lys ile asn ala pro pro pro asn leu
301/101	331/111
CAT ACC GGA GAC TTT ACA AAC CCA AAT GAC	GCA TAC AAG AAT TTG ATC AAC CTC AAA CCT
his thr gly asp phe thr asn pro asn asp	ala tyr lys asn leu ile asn leu lys pro
361/121	391/131
GCA ATT GAA GCA GGC TAT ACA GGA CGC GGG	GTA GAG GTA GGT ATC GTC GAT ACA GGC GAA
ala ile glu ala gly tyr thr gly arg gly	val glu val gly ile val asp thr gly glu
421/141	451/151
TCC GTC GGC AGC ATA TCC TTT CCC GAA CTG	TAT GGC AGA AAA GAA CAC GGC TAT AAC GAA
ser val gly ser ile ser phe pro glu leu	tyr gly arg lys glu his gly tyr asn glu
481/161	511/171
AAT TAC AAA AAC TAT ACG GCG TAT ATG CGG	AAG GAA GCG CCT GAA GAC GGA GGC GGT AAA
asn tyr lys asn tyr thr ala tyr met arg	lys glu ala pro glu asp gly gly gly lys
541/181	571/191
GAC ATT AAA GCT TCT TTC GAC GAT GAG GCC	GTT ATA GAG ACT GAA GCA AAG CCG ACG GAT
asp ile lys ala ser phe asp asp glu ala	val ile glu thr glu ala lys pro thr asp
601/201	631/211
ATC CGC CAC GTA AAA GAA ATC GGA CAC ATC	GAT GTG GTC TCC CAT ATT ATT GGC GGC CGT
ile arg his val lys glu ile gly his ile	asp val val ser his ile ile gly gly arg
661/221	691/231
TCC GTG GAC GGC AGA CCT GCA GGC GGT ATT	GCG CCC GAT GCG ACG CTA CAC ATA ATG AAT
ser val asp gly arg pro ala gly gly ile	ala pro asp ala thr leu his ile met asn
721/241	751/251
ACG CAT GAT GGA ACC AAG AAC GAA ATA ATG	TCT GCA GCC ATC CGC AAT GCA TGG GTC AAG
thr his asp gly thr lys asn glu ile met	ser ala ala ile arg asn ala trp val lys
781/261	811/271
CTG GGC GAA CGT GGC GTG CGC ATC GTC AAT	AAC AGT TTT GGA ACA ACA TCG AGG GCA GGC
leu gly glu arg gly val arg ile val asn	asn ser phe gly thr thr ser arg ala gly
841/281	871/291
ACT GCC GAC CAT TTC CAA ATA GCC AAT TCG	GAG GAG CAG TAC CGC CAA GCG TTG CTC GCC
thr ala asp his phe gln ile ala asn ser	glu glu gln tyr arg gln ala leu leu ala
901/301	931/311
TAT TCC GGC GGT GAT AAA ACA GAC GAG GGT	ATC CGC CTG ATG CAA CAG AGC GAT TAC GGC
tyr ser gly gly asp lys thr asp glu gly	ile arg leu met gln gln ser asp tyr gly
961/321	991/331
AAC TTG TCC TAC CAC ATC CGT AAT AAA AAC	ATG CTT TTC ATT TTT TCG GCA AGC AAT GAC
asn leu ser tyr his ile arg asn lys asn	met leu phe ile phe ser ala ser asn asp
1021/341	1051/351
GCA CAA GCT CAG CCC AAC ACA CTG ACC CTA	TTG CCA TTT TAT GAA AAA GAT GCT CAA AAA
ala gln ala gln pro asn thr leu thr leu	leu pro phe tyr glu lys asp ala gln lys
1081/361	1111/371
GGC ATT ATC ACA GTC GCA GGC GTA GAC CGC	AGT GGA GAA AAG TTC AAT GGC TCC AAC CAT
gly ile ile thr val ala gly val asp arg	ser gly glu lys phe asn gly ser asn his
1141/381	1171/391
TGC GGA ATT ACT GCC ATG TGG TGC CTA TCG	GCA CCC TAT GAA GCA AGC GTC CGT TTC ACC
cys gly ile thr ala met trp cys leu ser	ala pro tyr glu ala ser val arg phe thr

1201/401	CGT ACA AAC CCG ATT CAA ATT GCC GGA ACA	1231/411	TCC TTT TCC GCA CCC ATC GTA ACC GGC ACG
arg thr asn pro ile gln ile ala gly thr		ser phe ser ala pro ile val thr gly thr	
1261/421	GCG GCT CTG CTG CTG CAG AAA TAC CCG TGG	1291/431	ATG AGC AAC GAC AAC CTG CGT ACC ACG CTG
ala ala leu leu leu gln lys tyr pro trp		met ser asn asp asn leu arg thr thr leu	
1321/441	CTG ACA ACG GCT CAG GAC ATC GGT GCA GTC	1351/451	GGC GTG GAC AGC AAG TTC GGC TGG GGA CTG
leu thr thr ala gln asp ile gly ala val		gly val asp ser lys phe gly trp gly leu	
1381/461	CTG GAT GCG GGT AAG GCC ATG AAC GGA CCC	1411/471	GCG TCC TTT CCG TTC GGC GAC TTT ACC GCC
leu asp ala gly lys ala met asn gly pro		ala ser phe pro phe gly asp phe thr ala	
1441/481	GAT ACG AAA GGT ACA TCC GAT ATT GCC TAC	1471/491	TCC TTC CGT AAC GAC ATT TCA GGC ACG GGC
asp thr lys gly thr ser asp ile ala tyr		ser phe arg asn asp ile ser gly thr gly	
1501/501	GGC CTG ATC AAA AAA GGC GGC AGC CAA CTG	1531/511	CAA CTG CAC GGC AAC AAC ACC TAT ACG GGC
gly leu ile lys lys gly gly ser gln leu		gln leu his gly asn asn thr tyr thr gly	
1561/521	AAA ACC ATT ATC GAA GGC GGT TCG CTG GTG	1591/531	TTG TAC GGC AAC AAC AAA TCG GAT ATG CGC
lys thr ile ile glu gly gly ser leu val		leu tyr gly asn asn lys ser asp met arg	
1621/541	GTC GAA ACC AAA GGT GCG CTG ATT TAT AAC	1651/551	GGG GCG GCA TCC GGC GGT AGC CTG AAC AGC
val glu thr lys gly ala leu ile tyr asn		gly ala ala ser gly gly ser leu asn ser	
1681/561	GAC GGC ATT GTC TAT CTG GCA GAT ACC GAC	1711/571	CGA TCC GGC GCA AAC GAA ACC GTG CAC ATC
asp gly ile val tyr leu ala asp thr asp		arg ser gly ala asn glu thr val his ile	
1741/581	AAA GGC GAT CTG CAG CTG GGC GGC GAA GGT	1771/591	ACG CTG TAC ACA CGT TTG GGC AAA CTG CTG
lys gly asp leu gln leu gly gly glu gly		thr leu tyr thr arg leu gly lys leu leu	
1801/601	AAA GTG GAC GGT ACG GCG ATG ACC GGC GGC	1831/611	AAG CTG TAC ATG TCG GCA CGC GGC AAA GGC
lys val asp gly thr ala met thr gly gly		lys leu tyr met ser ala arg gly lys gly	
1861/621	GCA GGC TAT CTC AAC CGT ACC GGA CAA CGT	1891/631	GTT CCC TTC CTG AGT GCC GCC AAA ATC GGC
ala gly tyr leu asn arg thr gly gln arg		val pro phe leu ser ala ala lys ile gly	
1921/641	CGG GAT TAT TCT TTC TTC ACA AAC ATC GAA	1951/651	ACC GAC GGT GGT CTG CTG GCT TCC CTC GAC
arg asp tyr ser phe phe thr asn ile glu		thr asp gly gly leu leu ala ser leu asp	
1981/661	AGC GTC GAA AAA ACA GCG GGC AGT GAA GGC	2011/671	GAC ACG CTG TCC TAT TAT GTC CGT CGC GGC
ser val glu lys thr ala gly ser glu gly		asp thr leu ser tyr tyr val arg arg gly	
2041/681	AAT GCG GCA CGG ACT GCT TCG GCA GCG GCA	2071/691	CAT TCC GCG CCC GCC GGT CTG AAA CAC GCC
asn ala ala arg thr ala ser ala ala ala		his ser ala pro ala gly leu lys his ala	
2101/701	GTA GAA CAG GGC GGC AGC AAT CTG GAA AAC	2131/711	CTG ATG GTC GAA CTG GAT GCC TCC GAA TCA
val glu gln gly gly ser asn leu glu asn		leu met val glu leu asp ala ser glu ser	
2161/721	TCC GCA ACA CCC GAG ACG GTT GAA ACT GCG	2191/731	GCC GCC GAC CGC ACA GAT ATG CCG GGC ATC
ser ala thr pro glu thr val glu thr ala		ala ala asp arg thr asp met pro gly ile	
2221/741	CGC CCC TAC GGC GCA ACT TTC CGC GCA GCG	2251/751	GCA GCC GTA CAG CAT GCG AAT GCC GCC GAC
arg pro tyr gly ala thr phe arg ala ala		ala ala val gln his ala asn ala ala asp	
2281/761	GGT GTA CGC ATC TTC AAC AGT CTC GCC GCT	2311/771	ACC GTC TAT GCC GAC AGT ACC GCC GCC CAT
gly val arg ile phe asn ser leu ala ala		thr val tyr ala asp ser thr ala ala his	
2341/781	GCC GAT ATG CAG GGA CGC CGG CTG AAA GCC	2371/791	GTA TCG GAC GGG TTG GAC CAC AAC GCT ACG
ala asp met gln gly arg arg leu lys ala		val ser asp gly leu asp his asn ala thr	
2401/801	GGT CTG CGC GTC ATC GCG CAA ACC CAA CAG	2431/811	GAC GGT GGA ACG TGG GAA CAG GGC GGT GTT
gly leu arg val ile ala gln thr gln gln		asp gly gly thr trp glu gln gly gly val	
2461/821	GAA GGC AAA ATG CGC GGC AGT ACC CAA ACC	2491/831	GTC GGC ATT GCC GCG AAA ACC GGC GAA AAT
glu gly lys met arg gly ser thr gln thr		val gly ile ala ala lys thr gly glu asn	
2521/841	ACG ACA GCA GCC GCC ACA CTG GGC ATG GGA	2551/851	CAC AGC ACA TGG AGC GAA AAC AGT GCA AAT
thr thr ala ala ala thr leu gly met gly		his ser thr trp ser glu asn ser ala asn	

2581/861	2611/871
GCA AAA ACC GAC AGC ATT AGT CTG TTT GCA	GGC ATA CGG CAC GAT GCG GGC GAT ATC GGC
ala lys thr asp ser ile ser leu phe ala	gly ile arg his asp ala gly asp ile gly
2641/881	2671/891
TAT CTC AAA GGC CTG TTC TCC TAC GGA CGC	TAC AAA AAC AGC ATC AGC CGC AGC ACC GGT
tyr leu lys gly leu phe ser tyr gly arg	tyr lys asn ser ile ser arg ser thr gly
2701/901	2731/911
GCG GAC GAA CAT GCG GAA GGC AGC GTC AAC	GGC ACG CTG ATG CAG CTG GGC GCA CTG GGC
ala asp glu his ala glu gly ser val asn	gly thr leu met gln leu gly ala leu gly
2761/921	2791/931
GGT GTC AAC GTT CCG TTT GCC GCA ACG GGA	GAT TTG ACG GTC GAA GGC GGT CTG CGC TAC
gly val asn val pro phe ala ala thr gly	asp leu thr val glu gly gly leu arg tyr
2821/941	2851/951
GAC CTG CTC AAA CAG GAT GCA TTC GCC GAA	AAA GGC AGT GCT TTG GGC TGG AGC GGC AAC
asp leu leu lys gln asp ala phe ala glu	lys gly ser ala leu gly trp ser gly asn
2881/961	2911/971
AGC CTC ACT GAA GGC ACA CTG GTC GGA CTC	GCG GGT CTG AAG CTG TCG CAA CCC TTG AGC
ser leu thr glu gly thr leu val gly leu	ala gly leu lys leu ser gln pro leu ser
2941/981	2971/991
GAT AAA GCC GTC CTG TTT GCA ACG GCG GGC	GTG GAA CGC GAC CTG AAC GGA CGC GAC TAC
asp lys ala val leu phe ala thr ala gly	val glu arg asp leu asn gly arg asp tyr
3001/1001	3031/1011
ACG GTA ACG GGC GGC TTT ACC GGC GCG ACT	GCA GCA ACC GGC AAG ACG GGG GCA CGC AAT
thr val thr gly gly phe thr gly ala thr	ala ala thr gly lys thr gly ala arg asn
3061/1021	3091/1031
ATG CCG CAC ACC CGC CTG GTT GCC GGT CTG	GGC GCG GAT GTC GAA TTC GGC AAC GGC TGG
met pro his thr arg leu val ala gly leu	gly ala asp val glu phe gly asn gly trp
3121/1041	3151/1051
AAC GGC TTG GCA CGT TAC AGC TAC GCC GGT	TCC AAA CAG TAC GGC AAC CAC AGC GGA CGA
asn gly leu ala arg tyr ser tyr ala gly	ser lys gln tyr gly asn his ser gly arg
3181/1061	
GTC GGC GTA GGC TAC CGG TTC TGA	
val gly val gly tyr arg phe OPA	

SEQ ID n°10

SEQ ID n°9

1/1

ATG AAC ACA CGC ATC ATC GTT TCG GCT GCG TTC GTT GCG TTG GCA TTA GCA GGT TGC GGC  
 Met asn thr arg ile ile val ser ala ala phe val ala leu ala leu ala gly cys gly

61/21

TCA ATC AAT AAT GTA ACC GTT TCC GAC CAG AAA CTT CAG GAA CGT GCC GCG TTT GCC TTG  
 ser ile asn asn val thr val ser asp gln lys leu gln glu arg ala ala phe ala leu

121/41

GGC GTC AGC CAA AAT GCC GTA AAA ATC AGC AAC CGC AGC AAT GAA AGC ATA CGC ATC AAC  
 gly val ser gln asn ala val lys ile ser asn arg ser asn glu ser ile arg ile asn

181/61

TTT ACC GCA ACT GTG GGT AAG CGC GTG AGC CAA TGC TAT GTT ACC AGT GTA ATC AGC ACA  
 phe thr ala thr val gly lys arg val ser gln cys tyr val thr ser val ile ser thr

241/81

ATC GGC GTT ACC ACT TCC GAT GCA ATT TGT TTG GGA GGC GGA ACG CAC AAA GGC AAA AGT  
 ile gly val thr thr ser asp ala ile cys leu gly gly gly thr his lys gly lys ser

301/101

CAA TGC AAT GCT TTG CTT AAA GCG GCA GGC CGT TGC TAA  
 gln cys asn ala leu leu lys ala ala gly arg cys OCH

31/11

91/31

151/51

211/71

271/91

331/111

SEQ ID n°12

SEQ ID n°11

1/1

ATG CTG ACG TTT ATC GGA CTG CTG ATT ATC	31/11	GGG GTC ATC GTA TGG CTG CTG CTG ACG GAA
Met leu thr phe ile gly leu leu ile ile		gly val ile val trp leu leu leu thr glu
61/21	91/31	
AAA GTG TCG CCC ATC ATC GCA TTA ATC TTG		GTG CCG CTG TTT GGG GCG TTG CTG GCG GGG
lys val ser pro ile ile ala leu ile leu		val pro leu phe gly ala leu leu ala gly
121/41	151/51	
TTT GAT GTA TCC CAA TTA AAA GAA TTT TAT		TCG GGC GGC ACC AAA TCG GTG ATG CAG ATT
phe asp val ser gln leu lys glu phe tyr		ser gly gly thr lys ser val met gln ile
181/61	211/71	
GTG ATT ATG TTT ATG TTT TCC ATT TTG TTT		TTT GGA ATC ATG AAC GAT GTG GGG CTG TTC
val ile met phe met phe ser ile leu phe		phe gly ile met asn asp val gly leu phe
241/81	271/91	
CGT CCG ATG ATA GGC GGT TTG ATT AAG CTG		ACT CGG GGT AAT ATC GTG GCA GTG AGT GTG
arg pro met ile gly gly leu ile lys leu		thr arg gly asn ile val ala val ser val
301/101	331/111	
GGG ACG GTC TTG GTG TCG GTG GTG GCG CAG		TTG GAC GGG GCG GGT GCG ACG ACG TTT TTA
gly thr val leu val ser val val ala gln		leu asp gly ala gly ala thr thr phe leu
361/121	391/131	
TTG GTC GTC CCC GCC CTT TTG CCG CTT TAC		AAG CGT CTG CAT ATG AAT CCT TAC CTG CTG
leu val val pro ala leu leu pro leu tyr		lys arg leu his met asn pro tyr leu leu
421/141	451/151	
TTT TTG CTG CTG ACT TCC AGT GCG GGA TTG		ATT AAC CTT CTG CCG TGG GGC GGG CCG ACC
phe leu leu leu thr ser ser ala gly leu		ile asn leu leu pro trp gly gly pro thr
481/161	511/171	
GGG CGG GTT GCA AGC GTG TTG GGC GCA GAT		GTG GGC GAA TTG TAT AAA CCT TTG TTG ACG
gly arg val ala ser val leu gly ala asp		val gly glu leu tyr lys pro leu leu thr
541/181	571/191	
GTG CAA ATT ATC GGT GTG GTG TTT ATC CTT		GCG CTG TCC CTG CTT TTG GGT GTG CGT GAA
val gln ile ile gly val val phe ile leu		ala leu ser leu leu leu gly val arg glu
601/201	631/211	
AAA AGG CGG ATT GTC CGG GAG TTG GGC GCG		TTG CCC GCC GTG GCG GAT TTG ATA AAG CCG
lys arg arg ile val arg glu leu gly ala		leu pro ala val ala asp leu ile lys pro
661/221	691/231	
GTG CCT TTG TCG GAA GAA GAA CAA AAA TTG		GCG CGT CCG AAA CTG TTT TGG TGG AAT GTC
val pro leu ser glu glu glu gln lys leu		ala arg pro lys leu phe trp trp asn val
721/241	751/251	
CTG CTG TTT TTG GCG GCG ATG AGC CTG CTT		TTT TCG GGC ATC TTC CCG CCG GGT TAT GTA
leu leu phe leu ala ala met ser leu leu		phe ser gly ile phe pro pro gly tyr val
781/261	811/271	
TTT ATG CTG GCT GCA ACG GCG GCG TTG CTT		TTG AAT TAC CGC AGC CCG CAG GAA CAG ATG
phe met leu ala ala thr ala ala leu leu		leu asn tyr arg ser pro gln glu gln met
841/281	871/291	
GAG CGG ATT TAT GCC CAC GCC GGC GGC GCG		GTG ATG ATG GCG TCC ATT ATT TTG GCG GCA
glu arg ile tyr ala his ala gly gly ala		val met met ala ser ile ile leu ala ala
901/301	931/311	
GGT ACG TTT TTG GGG ATT TTG AAG GGT GCG		GGG ATG TTG GAC GCG ATT TCC AAA GAC ATT
gly thr phe leu gly ile leu lys gly ala		gly met leu asp ala ile ser lys asp ile
961/321	991/331	
GTG CAT ATC CTG CCG GAC GCG CTG CTG CCT		TAT CTG CAT ATT GCC ATC GGT GTG TTG GGC
val his ile leu pro asp ala leu leu pro		tyr leu his ile ala ile gly val leu gly
1021/341	1051/351	
ATT CCG CTT GAG TTG GTT TTG AGT ACG GAC		GCT TAT TAT TTC GGA CTG TTT CCG ATT GTG
ile pro leu glu leu val leu ser thr asp		ala tyr tyr phe gly leu phe pro ile val
1081/361	1111/371	
GAG CAG ATT ACC TCG CAG GCG GGC GTG GCG		CCC GAA GCA GCA GGT TAT GCG ATG TTG ATC
glu gln ile thr ser gln ala gly val ala		pro glu ala ala gly tyr ala met leu ile
1141/381	1171/391	
GGC AGT ATC GTC GGC ACT TTT GTT ACG CCG		CTT TCG CCG GCT TTG TGG ATG GGC TTG GGT
gly ser ile val gly thr phe val thr pro		leu ser pro ala leu trp met gly leu gly
1201/401	1231/411	

TTG GCG AAA TTG TCG ATG GGC AAA CAC ATC CGT TAT TCG TTT TTT TGG GCG TGG GGT TTG  
leu ala lys leu ser met gly lys his ile arg tyr ser phe phe trp ala trp gly leu  
1261/421 1291/431  
TCG CTG GCG ATA TTG GCC AGT TCG ATA GCG GCA GGA ATC GTG CCT CTG CCG TAA  
ser leu ala ile leu ala ser ser ile ala ala gly ile val pro leu pro OCH

---

SEQ ID n°14

SEQ ID n°13

1/1	31/11
ATG GGC ATC CAT CTC GAC TTC GGC ATT AGT	CCT AAA ACG TTC CGA CAG ACT TAT CTG TAT
Met gly ile his leu asp phe gly ile ser	pro lys thr phe arg gln thr tyr leu tyr
61/21	91/31
CAA AAG CCC AAG CTC TTT AAA GGA GCG GTT	CGG AAT CTC GAA GCC GCA TCT TGT AAA TAT
gln lys pro lys leu phe lys gly ala val	arg asn leu glu ala ala ser cys lys tyr
121/41	151/51
ATC AAC GAG ATA TAC CAA CGA GCA GAC CCA	ACC GCA CCG CTG TTT CAT CTG CGT AAA AAA
ile asn glu ile tyr gln arg ala asp pro	thr ala pro leu phe his leu arg lys lys
181/61	211/71
GGC GCA ATC GTT CCT AAA GAA GAA TAC GTC	GAA AGT TTC GAC GAT TTG GGC AAA ACT CGC
gly ala ile val pro lys glu glu tyr val	glu ser phe asp asp leu gly lys thr arg
241/81	271/91
TAC CGT TTT ATT AAA TCC GTT ATC TAC GAA	CAT ATG AAG AAT GGT GCG TCG TTA GTC TAT
tyr arg phe ile lys ser val ile tyr glu	his met lys asn gly ala ser leu val tyr
301/101	331/111
AAC CAT ATT AAC AAC GAG CCG TTT TCA GAC	CAT ATC GCC CGT CAA GTC GCC CGC TTT GCC
asn his ile asn asn glu pro phe ser asp	his ile ala arg gln val ala arg phe ala
361/121	391/131
GGC GCA CAT ACT ATT GTT AGT GGA TAT CTT	GCT TTT GGC AGC GAC GAA TCT TAT AAA AAC
gly ala his thr ile val ser gly tyr leu	ala phe gly ser asp glu ser tyr lys asn
421/141	451/151
CAT TGG GAT ACC CGC GAT GTG TAT GCC ATC	CAG CTT TTC GGC AAG AAA CGT TGG CAA CTT
his trp asp thr arg asp val tyr ala ile	gln leu phe gly lys lys arg trp gln leu
481/161	511/171
ACT GCC CCT GAT TTC CCT ATG CCA TTG TAT	ATG CAA CAG ACT AAA GAT ACT GAT ATT TCC
thr ala pro asp phe pro met pro leu tyr	met gln gln thr lys asp thr asp ile ser
541/181	571/191
ATT CCT GAA CAT ATC GAT ATG GAT ATT ATC	CTT GAA GCA GGT GAT GTC CTC TAC ATC CCA
ile pro glu his ile asp met asp ile ile	leu glu ala gly asp val leu tyr ile pro
601/201	631/211
CGC GGT TGG TGG CAC AGA CCT ATC CCG CTC	GGC TGT GAA ACC TTC CAC TTC GCT GTC GGT
arg gly trp trp his arg pro ile pro leu	gly cys glu thr phe his phe ala val gly
661/221	691/231
ACC TTC CCG CCC AAC GGC TAT AAT TAC CTC	GAG TGG CTA ATG AAG AAA TTC CCC ACG ATA
thr phe pro pro asn gly tyr asn tyr leu	glu trp leu met lys lys phe pro thr ile
721/241	751/251
GAA AGT CTG CGC CAC AGT TTC TCA GAC TGG	GAG CAA GAT AGG ACG CGT ATC AAC GAT ACT
glu ser leu arg his ser phe ser asp trp	glu gln asp arg thr arg ile asn asp thr
781/261	811/271
GCC GCA CAA ATT GCT GCC ATG ATT GCC GAC	CCC GTC AAT TAC GAA GCC TTC AGT GAA GAC
ala ala gln ile ala ala met ile ala asp	pro val asn tyr glu ala phe ser glu asp
841/281	871/291
TTC CTC GGC AAA GAA CGC ACC GAT ACC GCT	TTT CAT CTC GAA CAG TTC GCG AAT CCC AAC
phe leu gly lys glu arg thr asp thr ala	phe his leu glu gln phe ala asn pro asn
901/301	931/311
GCT ACT CCG CTT TCA GAC GAC GTC AGG TTG	AGA CTA AAT GCC AAT AAT TTG GAT ACG TTG
ala thr pro leu ser asp asp val arg leu	arg leu asn ala asn asn leu asp thr leu
961/321	991/331
GAA AAG GGA TAT TTG ATT GGG AAT GGG ATG	AAG ATA AGC GTA GAT GAA TTG GGG AAA AAA
glu lys gly tyr leu ile gly asn gly met	lys ile ser val asp glu leu gly lys lys
1021/341	1051/351
GTG TTA GAA CAC ATC GGT AAG AAT GAA CCG	TTA TTG TTG AAA AAT CTA CTG GTT AAC TTC
val leu glu his ile gly lys asn glu pro	leu leu leu lys asn leu leu val asn phe
1081/361	1111/371
AAT CAG GGA AAA CAT GAA GAA GTT AGG AAG	TTG ATT TAT CAG TTG ATA GAG TTA GAT TTT
asn gln gly lys his glu glu val arg lys	leu ile tyr gln leu ile glu leu asp phe
1141/381	
CTG GAA CTT TTG TGA	
leu glu leu leu OPA	

SEQ ID n°16

SEQ ID n°15

1/1

31/11

ATG AAT AGA CCC AAG CAA CCC TTC TTC CGT CCC GAA GTC GCC GTT GCC CGC CAA ACC AGC  
 Met asn arg pro lys gln pro phe phe arg pro glu val ala val ala arg gln thr ser  
 61/21 91/31  
 CTG ACG GGT AAA GTG ATT CTG ACA CGA CCG TTG TCA TTT TCC CTA TGG ACG ACA TTT GCA  
 leu thr gly lys val ile leu thr arg pro leu ser phe ser leu trp thr thr phe ala  
 121/41 151/51  
 TCG ATA TCT GCG TTA TTG ATT ATC CTG TTT TTG ATA TTT GGT AAC TAT ACG CGA AAG ACA  
 ser ile ser ala leu leu ile ile leu phe leu ile phe gly asn tyr thr arg lys thr  
 181/61 211/71  
 ACA GTG GAG GGA CAA ATT TTA CCT GCA TCG GGC GTA ATC AGG GTG TAT GCA CCG GAT ACG  
 thr val glu gly gln ile leu pro ala ser gly val ile arg val tyr ala pro asp thr  
 241/81 271/91  
 GGG ACA ATT ACA GCG AAA TTC GTG GAA GAT GGA GAA AAG GTT AAG GCT GGC GAC AAG CTA  
 gly thr ile thr ala lys phe val glu asp gly glu lys val lys ala gly asp lys leu  
 301/101 331/111  
 TTT GCG CTT TCG ACC TCA CGT TTC GGC GCA GGA GAT AGC GTG CAG CAG CAG TTG AAA ACG  
 phe ala leu ser thr ser arg phe gly ala gly asp ser val gln gln gln leu lys thr  
 361/121 391/131  
 GAG GCA GTT TTG AAG AAA ACG TTG GCA GAA CAG GAA CTG GGT CGT CTG AAG CTG ATA CAC  
 glu ala val leu lys lys thr leu ala glu gln glu leu gly arg leu lys leu ile his  
 421/141 451/151  
 GGG AAT GAA ACG CGC AGC CTT AAA GCA ACT GTC GAA CGT TTG GAA AAC CAG AAA CTC CAT  
 gly asn glu thr arg ser leu lys ala thr val glu arg leu glu asn gln lys leu his  
 481/161 511/171  
 ATT TCG CAA CAG ATA GAC GGT CAG AAA AGG CGC ATT AGA CTT GCG GAA GAA ATG TTG CAG  
 ile ser gln gln ile asp gly gln lys arg arg ile arg leu ala glu glu met leu gln  
 541/181 571/191  
 AAA TAT CGT TTC CTA TCC GCC AAT GAT GCA GTG CCA AAA CAA GAA ATG ATG AAT GTC AAG  
 lys tyr arg phe leu ser ala asn asp ala val pro lys gln glu met met asn val lys  
 601/201 631/211  
 GCA GAG CTT TTA GAG CAG AAA GCC AAA CTT GAT GCC TAC CGC CGA GAA GAA GTC GGG CTG  
 ala glu leu leu glu gln lys ala lys leu asp ala tyr arg arg glu glu val gly leu  
 661/221 691/231  
 CTT CAG GAA ATC CGC ACG CAG AAT CTG ACA TTG GCC AGC CTC CCC CAA GCG GCA TGA  
 leu gln glu ile arg thr gln asn leu thr leu ala ser leu pro gln ala ala OPA

SEQ ID n°18

SEQ ID n°17

1/1	31/11
ATG ATG AAT GTC GAG GCA GAG CTT TTA GAG	CAG AAA GCC AAA CTT GAT GCC TAC GGC CGA
Met met asn val glu ala glu leu leu glu	gln lys ala lys leu asp ala tyr gly arg
61/21	91/31
GAA GAA GCC GGG CTG CTT CAG GAA ATC CGC	ACG CAG AAT CTG ACA TTG GCC AGC CTC CCC
glu glu ala gly leu leu gln glu ile arg	thr gln asn leu thr leu ala ser leu pro
121/41	151/51
AAA CGG CAT GAG ACA GAA CAA AGC CAG CTT	GAA CGC ACC ATG GCC GAT ATT TCT CAA GAA
lys arg his glu thr glu gln ser gln leu	glu arg thr met ala asp ile ser gln glu
181/61	211/71
GTT TTG GAT TTT GAA ATG CGC TCT GAA CAA	ATC ATC CGT GCA GGA CGG TCG GGT TAT ATA
val leu asp phe glu met arg ser glu gln	ile ile arg ala gly arg ser gly tyr ile
241/81	271/91
GCA ATA CCG AAC GTC GAA GTC GGA CAG CAG	GTT GAT CCT TCC AAA CTG CTC TTG AGC ATT
ala ile pro asn val glu val gly gln gln	val asp pro ser lys leu leu leu ser ile
301/101	331/111
GTT CCC GAA CGT ACC GAG CTA TAT GCC CAT	CTA TAT ATC CCC AGC AGT GCA GCA GGC TTT
val pro glu arg thr glu leu tyr ala his	leu tyr ile pro ser ser ala ala gly phe
361/121	391/131
ATC AAG CCG AAA GAC AAG GTT GTC CTA CGT	TAT CAG GCA TAT CCC TAT CAA AAA TTC GGG
ile lys pro lys asp lys val val leu arg	tyr gln ala tyr pro tyr gln lys phe gly
421/141	451/151
CTT GCT TCC GGC AGT GTC GTA TCA GTA GCA	AAA ACG GCA CTG GGC AGA CAG GAA TTG TCG
leu ala ser gly ser val val ser val ala	lys thr ala leu gly arg gln glu leu ser
481/161	511/171
GGA TTG GGC ATG GTA TCC TCC GAT TTG GCG	AAG AGC AAC GAA CCT GTT TAT CTC GTG AAA
gly leu gly met val ser ser asp leu ala	lys ser asn glu pro val tyr leu val lys
541/181	571/191
ATA AAA CCC GAC AAA CCA ACC ATC ACT GCA	TAC GGT GAG GAA AAA CCG CTG CAA ATC GGC
ile lys pro asp lys pro thr ile thr ala	tyr gly glu glu lys pro leu gln ile gly
601/201	631/211
ATG ACG TTG GAA GCA GAC ATC CTG CAC GAG	AAA CGG CGG CTG TAC GAA TGG GTA TTG GAG
met thr leu glu ala asp ile leu his glu	lys arg arg leu tyr glu trp val leu glu
661/221	
CTG ATT TAT AGT ATG TCG GGC AAA CTG TAA	
leu ile tyr ser met ser gly lys leu OCH	

SEQ ID n°20

SEQ ID n°19

```

1/1
ATG AAA TTT TTT CCT GCT CCA TGT CTG TTG GTT ATC CTG GCT GTC ATA CCC CTT AAA ACC
Met lys phe phe pro ala pro cys leu leu val ile leu ala val ile pro leu lys thr
61/21
TTA GCT GCC GAT GAA AAC GAT GCA GAA CTT ATC CGT TCC ATG CAG CGT CAG CAG CAC ATA
leu ala ala asp glu asc asp ala glu leu ile arg ser met glc arg glc glc his ile
121/41
GAT GCT GAA TTG TTA ACT GAT GCA AAT GTC CGT TTC GAG CAA CCA TTG GAG AAG AAC AAT
asp ala glu leu leu thr asp ala asc val arg phe glu glc pro leu glu lys asc asc
181/61
TAT GTC CTG AGT GAA GAT GAA ACA CCG TGT ACT CGG GTA AAT TAC ATT AGT TTA GAT GAT
tyr val leu ser glu asp glu thr pro cys thr arg val asc tyr ile ser leu asp asp
241/81
AAG ACG GCG CGC AAA TTT TCT TTT CTT CCT TCT GTG CTC ATG AAA GAA ACA GCT TTT AAA
lys thr ala arg lys phe ser phe leu pro ser val leu met lys glu thr ala phe lys
301/101
ACT GGG ATG TGT TTA GGT TCC AAT AAT TTG AGC AGG CTA CAA AAA GCC GCG CAA CAG ATA
thr gly met cys leu gly ser asc asc leu ser arg leu glc lys ala ala glc glc ile
361/121
CTG ATT GTG CGT GGC TAC CTC ACT TCC CAA GCT ATT ATC CAA CCA CAG AAT ATG GAT TCG
leu ile val arg gly tyr leu thr ser glc ala ile ile glc pro glc asc met asp ser
421/141
GGA ATT CTG AAA TTA CGG GTA TCA GCA GGC GAA ATC AGG GAT ATC CGC TAT GAA GAA AAA
gly ile leu lys leu arg val ser ala gly glu ile arg asp ile arg tyr glu glu lys
481/161
CGG GAT GCG AAG TCT GCC GAG GGC AGT ATT AGT GCA TTC AAT AAC AAA CTT CCC TTA TAT
arg asp ala lys ser ala glu gly ser ile ser ala phe asc asc lys leu pro leu tyr
541/181
AGG AAC AAA ATT CTC AAT CTT CGC GAT GTA GAG CAG GGC TTG GAA AAC CTG CGT CGT TTG
arg asc lys ile leu asc leu arg asp val glu glc gly leu glu asc leu arg arg leu
601/201
CCG AGT GTT AAA ACA GAT ATT CAG ATT ATA CCG TCC GAA GAA GAA GGC AAA AGC GAT TTA
pro ser val lys thr asp ile glc ile ile pro ser glu glu glu gly lys ser asp leu
661/221
CAG ATC AAA TGG CAG CAG AAT AAA CCC ATA CGG TTC AGT ATC GGT ATA GAT GAT GCG GGC
glc ile lys trp glc glc asc lys pro ile arg phe ser ile gly ile asp asp ala gly
721/241
GGC AAA ACG ACC GGC AAA TAT CAA GGA AAT GTC GCT TTA TCG TCC GAT AAC CCT TTG GGC
gly lys thr thr gly lys tyr glc gly asc val ala leu ser ser asp asc pro leu gly
781/261
TTA AGC GAT TCG TTT TAT GTT TCA TAT GGA CGC GGT TTG GTG CAC AAA ACG GAC TTG ACT
leu ser asp ser phe tyr val ser tyr gly arg gly leu val his lys thr asp leu thr
841/281
GCT GCC ACC GGT ACG GAA ACT GAA AGC GGA TCC AGA AGT TAC AGC GTG CAT TAT TCG GTG
ala ala thr gly thr glu thr glu ser gly ser arg ser tyr ser val his tyr ser val
901/301
CCC GTA AAA AAA TGG CTG TTT TCT TTT AAT CAC AAT GGA CAT CGT TAC CAC GAA GCA ACC
pro val lys lys trp leu phe ser phe asc his asc gly his arg tyr his glu ala thr
961/321
GAA GGC TAT TCC GTC AAT TAC GAT TAC AAC GGC AAA CAA TAT CAG AGC AGC CTG GCC GCC
glu gly tyr ser val asc tyr asp tyr asc gly lys glc tyr glc ser ser leu ala ala
1021/341
GAG CGC ATG CTT TGG CCC CCC AGC TTT CCT CAA ACT TCA GTC CGA ATG AAA TTA TGG ACA
glu arg met leu trp pro pro ser phe pro glc thr ser val arg met lys leu trp thr
1081/361
CGC CAA ACC TAT AAA TAC ATC GAC GAT GCC GAA ATC GAA GTG CAA CGC CGC CGC TCT GCA
arg glc thr tyr lys tyr ile asp asp ala glu ile glu val glc arg arg arg ser ala
1141/381
GGC TGG GAA GCC GAA TTG CGC CAC CGT GCT TAC CTC CAC CGT TGG CAG CTT GAC GGC AAG
gly trp glu ala glu leu arg his arg ala tyr leu his arg trp glc leu asp gly lys
1201/401

```

TTG TCT TAC AAA CGC GGG ACC GGC ATG CGC CAA AGT ATG CCC GCA CCT GAA GAA AAC GGC  
 leu ser tyr lys arg gly thr gly met arg glc ser met pro ala pro glu glu asc gly  
 1261/421 1291/431  
 GGC GGT ACT ATT CCA GCC ACA TCC CGT ATG AAA ATC ATA ACC GCC GGA TTG GAT GCA GCG  
 gly gly thr ile pro ala thr ser arg met lys ile ile thr ala gly leu asp ala ala  
 1321/441 1351/451  
 GCC CCG TCT ATG TTG GGC AAA CAG CAG TTT TTC TAC GCA ACC GCC ATT CAA GCT CAA TGG  
 ala pro ser met leu gly lys glc glc phe phe tyr ala thr ala ile glc ala glc trp  
 1381/461 1411/471  
 AAC AAA ACG CCT TTG GTT GCC CAA GAC AAG TTG TCT ATC GGC AGC CGC TAC ACC GTT CGC  
 asc lys thr pro leu val ala glc asp lys leu ser ile gly ser arg tyr thr val arg  
 1441/481 1471/491  
 GGA TTT GAT GGG GAG CAG AGT CTT TTC GGA GAG CGA GGT TTC TAC TGG CAG AAT ACT TTA  
 gly phe asp gly glu glc ser leu phe gly glu arg gly phe tyr trp glc asc thr leu  
 1501/501 1531/511  
 ACT TGG TAT TTT CAT CCG AAC CAT CAG TTC TAT CTC GGT GCG GAC TAT GGC CGC GTA TCT  
 thr trp tyr phe his pro asc his glc phe tyr leu gly ala asp tyr gly arg val ser  
 1561/521 1591/531  
 GGC GAA AGT GCA CAA TAT GTA TCG GGC AAG CAG CTG ATG GGT GCA GTG GTC GGC TTC AGA  
 gly glu ser ala glc tyr val ser gly lys glc leu met gly ala val val gly phe arg  
 1621/541 1651/551  
 GGA GGG CAT AAA GTA GGC GGT ATG TTT GCT TAT GAT CTG TTT GCC GGC AAG CCG CTT CAT  
 gly gly his lys val gly gly met phe ala tyr asp leu phe ala gly lys pro leu his  
 1681/561 1711/571  
 AAA CCC AAA GGC TTT CAG ACG ACC AAC ACC GTT TAC GGC TTC AAC TTG AAT TAC AGT TTC  
 lys pro lys gly phe glc thr thr asc thr val tyr gly phe asc leu asc tyr ser phe  
 1741/581  
 TAA  
 OCH

SEQ ID n°22

SEQ ID n°21

1/1	31/11
ATG ATT GAA TTT GTC CGA GCC AAA AAA CGG	CTG CTT TGG GCA TTT GTG CTT TTG CTT GTG
Met ile glu phe val arg ala lys lys arg	leu leu trp ala phe val leu leu leu val
61/21	91/31
TGG ACG TGC GGT TAC CGA TAC GCC GCC GAC	AAG GCC GAA GCG AAA CAA ACC GCC CTG ATT
trp thr cys gly tyr arg tyr ala ala asp	lys ala glu ala lys gln thr ala leu ile
121/41	151/51
GCC ACC TAT CGG CAT TCT TCT ATG GTT GCG	GCG GAA CAA TAC GCC TTG CAG CTT AAA AAA
ala thr tyr arg his ser ser met val ala	ala glu gln tyr ala leu gln leu lys lys
181/61	211/71
GCG CAG GAC GAA AGG CAG CGG TGG TAC GAC	TTT TCC CAA AAA CAA GGA AGA AAG CCC GTG
ala gln asp glu arg gln arg trp tyr asp	phe ser gln lys gln gly arg lys pro val
241/81	271/91
AAA AAA CAG TAT CCG CCG CAA ACG AAA AAA	GCC GGC TAT CTG AAA ACC AAG GAA GAA CTG
lys lys gln tyr pro pro gln thr lys lys	ala gly tyr leu lys thr lys glu glu leu
301/101	331/111
CTT GCG GAA TTG GCT TGC CTT AAA GCG GAA	ATG GCT GCC CTA AAA AAG CTC GAT GCC TTA
leu ala glu leu ala cys leu lys ala glu	met ala ala leu lys lys leu asp ala leu
361/121	391/131
ATC TAT GGG AAA GAA GTG CGG CAG AAA GAA	CGC AAC TCG TCG CAG GGT TAA
ile tyr gly lys glu val arg gln lys glu	arg asn ser ser gln gly OCH

SEQ ID n°24

SEQ ID n°23

1/1

31/11

ATG CAA TAC AGC ACA CTG GCA GGA CAA ACC	GAC AAC TCC CTC GTT TCC AAT AAT TTC GGG
Met gln tyr ser thr leu ala gly gln thr	asp asn ser leu val ser asn asn phe gly
61/21	91/31
TTT TTG CGC CTG CCG CTT AAT TTT ATG CCG	TAT GAA AGT CAT GCC GAT TGG GTT ATT ACC
phe leu arg leu pro leu asn phe met pro	tyr glu ser his ala asp trp val ile thr
121/41	151/51
GGC GTG CCT TAT GAT ATG GCG GTT TCA GGG	CGT TCC GGC GCG CGT TTC GGT CCT GAA GCC
gly val pro tyr asp met ala val ser gly	arg ser gly ala arg phe gly pro glu ala
181/61	211/71
ATC CGG CGC GCC TCC GTC AAC CTC GCT TGG	GAG CAC CGC AGG TTT CCA TGG ACA TTT GAT
ile arg arg ala ser val asn leu ala trp	glu his arg arg phe pro trp thr phe asp
241/81	271/91
GTG CGC GAA CGC CTG AAC ATT ATT GAT TGC	GGC GAC TTG GTT TTT TCT TTT GGC GAC AGC
val arg glu arg leu asn ile ile asp cys	gly asp leu val phe ser phe gly asp ser
301/101	331/111
AGG GAT TTT GTC GAA AAA ATG GAA GCG CAC	GCC GGC AAA TTA CTT TCT TCC GGC AAA CGC
arg asp phe val glu lys met glu ala his	ala gly lys leu leu ser ser gly lys arg
361/121	391/131
TGT TTG AGT TTG GGC GGC GAC CAT TTC ATT	ACC CTC CCG TTG TTG CGC GCC CAC GCC CGC
cys leu ser leu gly gly asp his phe ile	thr leu pro leu leu arg ala his ala arg
421/141	451/151
TAT TTC GGC AAA CTC GCA CTG ATT CAT TTT	GAC GCG CAC ACC GAC ACC TAC GAC AAC GGC
tyr phe gly lys leu ala leu ile his phe	asp ala his thr asp thr tyr asp asn gly
481/161	511/171
AGC GAA TAC GAC CAC GGT ACG ATG TTC TAT	ACC GCC CCC AAG GAA GGC CTC ATC GAC CCG
ser glu tyr asp his gly thr met phe tyr	thr ala pro lys glu gly leu ile asp pro
541/181	571/191
TCC CGT TCC GTA CAA ATC GGC ATA CGT ACC	GAA CAC AGT AAA AAA TTG CCT TTT ACT GTG
ser arg ser val gln ile gly ile arg thr	glu his ser lys lys leu pro phe thr val
601/201	631/211
TTG ACC GCC CCC CAA GTT AAT GAA GAC AGT	GTT GAA GAG ACC GTC CGT AAA ATC AAA GAA
leu thr ala pro gln val asn glu asp ser	val glu glu thr val arg lys ile lys glu
661/221	691/231
ACC GTC GGC AAT ATG CCC GTT TAC CTG ACT	TTC GAC ATA GAC TGC CTC GAC CCG TCG TTC
thr val gly asn met pro val tyr leu thr	phe asp ile asp cys leu asp pro ser phe
721/241	751/251
GCC CCC GGG ACC GGT ACG CCC GTA TGC GGC	GGC TTG AGC AGC GAC AGG GCA TTA AAA ATC
ala pro gly thr gly thr pro val cys gly	gly leu ser ser asp arg ala leu lys ile
781/261	811/271
CTA CGT GGG CTG ACG GAT CTC GAC ATC GTC	GGT ATG GAT GTT GTA GAA GTT GCC CCC TCT
leu arg gly leu thr asp leu asp ile val	gly met asp val val glu val ala pro ser
841/281	871/291
TAC GAC CAA TCC GAC ATT ACC GCT TTG GCC	GGC GCC ACA ATT GCC TTG GAA ATG CTT TAC
tyr asp gln ser asp ile thr ala leu ala	gly ala thr ile ala leu glu met leu tyr
901/301	
CTT CAA GGT GCG AAA AAG GAC TGA	
leu gln gly ala lys lys asp OPA	

SEQ ID n°26

SEQ ID n°25

1/1	31/11
ATG GAG CAG TCG GGC AAA TTC AGT TGG TCT	GCG GCA GCT TTT TGG GAC ATT CCC TAC CCC
Met glu gln ser gly lys phe ser trp ser	ala ala ala phe trp asp ile pro tyr pro
61/21	91/31
GTC ACC AGG CGG ATT GCC TCA AGT TTG TAT	TCG ACC GAA TAT TTT GTC GTA TGC TTT CTG
val thr arg arg ile ala ser ser leu tyr	ser thr glu tyr phe val val cys phe leu
121/41	151/51
CGT TTG ATG CCA CTC TCT CCG TGT AAT CTG	TAT TTT GTC ACC CAT CTG CGT ACC AAT GAA
arg leu met pro leu ser pro cys asn leu	tyr phe val thr his leu arg thr asn glu
181/61	211/71
TCG GAA ATA GAA AGA TGG TCT GCT GTT CCC	TGC CAA ATA GTA TTG AAC GAC GGC AAG TCG
ser glu ile glu arg trp ser ala val pro	cys gln ile val leu asn asp gly lys ser
241/81	271/91
GAA TTC GGC GGA TTC GCA TTT GAA GTG CAA	CTT TCC CTA ACA GAA AAA GGC CAG TAT GCG
glu phe gly gly phe ala phe glu val gln	leu ser leu thr glu lys gly gln tyr ala
301/101	331/111
GTA GCA TAC GAC CTT TCC TGC AAG AAA GAT	TGC CAT GAG CTA CAC GCA ACT GAC CCA AGG
val ala tyr asp leu ser cys lys lys asp	cys his glu leu his ala thr asp pro arg
361/121	391/131
CGA ACG ATA CCA CAT CCA ATA CCT GTC CCG	CCA CTG CAC CGT CAC CGA AAT CGC CAA ACA
arg thr ile pro his pro ile pro val pro	pro leu his arg his arg asn arg gln thr
421/141	
GCT TAA	
ala OCH	

SEQ ID n°28

SEQ ID n°27

1/1

31/11

ATG CAA AAC GGC GGG GGA AAG ATT TAC CAG	ACG GCG GAC AAT GTG GAA GGG ATT ATG CTG
Met gln asn gly gly gly lys ile tyr gln	thr ala asp asn val glu gly ile met leu
61/21	91/31
TTG AAG GTA GTA CCT GAG CGT ACC GTT TCG	GCA GAT GCA AAA ACC AGA GAC CCG ATG TGG
leu lys val val pro glu arg thr val ser	ala asp ala lys thr arg asp pro met trp
121/41	151/51
GAC AAT GCG GCT TTA CAG ACC AGC GAA GGC	GTA AAT TTT ATT GCT CGT TTC CTA GGA TTT
asp asn ala ala leu gln thr ser glu gly	val asn phe ile ala arg phe leu gly phe
181/61	211/71
TTT AGC GAT GGG GAA TAC CGC TAT GTG GAT	GTC CTG CAA CCC AAC CAT TCC GAT ATT ATT
phe ser asp gly glu tyr arg tyr val asp	val leu gln pro asn his ser asp ile ile
241/81	271/91
CGG TAT TCA GGT AAA GAT TTT CCG CTA AAT	CAA ATA CTT AAC CAT ATA CAC CCC GCC CGT
arg tyr ser gly lys asp phe pro leu asn	gln ile leu asn his ile his pro ala arg
301/101	331/111
TAT GCG GTA ACG TTC GAA AAC AAT GTC GAT	TCC AAG CTG CGC AGG CAC TGA
tyr ala val thr phe glu asn asn val asp	ser lys leu arg arg his OPA

SEQ ID n°30

SEQ ID n°29

1/1

31/11

ATG ACA TTG CTC AAT CTA ATG ATA ATG CAA	GAT TAC GGT ATT TCC GTT TGC CTG ACA CTG
Met thr leu leu asn leu met ile met gln	asp tyr gly ile ser val cys leu thr leu
61/21	91/31
ACG CCC TAT TTG CAA CAT GAA CTA TTT TCG	GCT ATG AAA TCC TAT TTT TCC AAA TAT ATC
thr pro tyr leu gln his glu leu phe ser	ala met lys ser tyr phe ser lys tyr ile
121/41	151/51
CTA CCC GTT TCA CTT TTT ACC TTG CCA CTA	TCC CTT TCC CCA TCC GTT TCG GCT TTT ACG
leu pro val ser leu phe thr leu pro leu	ser leu ser pro ser val ser ala phe thr
181/61	211/71
CTG CCT GAA GCA TGG CGG GCG GCG CAG CAA	CAT TCG GCT GAT TTT CAA GCG TCC CAT TAC
leu pro glu ala trp arg ala ala gln gln	his ser ala asp phe gln ala ser his tyr
241/81	271/91
CAG CGT GAT GCA GTG CGC GCA CGG CAA CAA	CAA GCC AAG GCC GCA TTC CTT CCC CAT GTA
gln arg asp ala val arg ala arg gln gln	gln ala lys ala ala phe leu pro his val
301/101	331/111
TCC GCC AAT GCC AGC TAC CAG CGC CAG CCG	CCA TCG ATT TCT TCC ACC CGC GAA ACA CAG
ser ala asn ala ser tyr gln arg gln pro	pro ser ile ser ser thr arg glu thr gln
361/121	391/131
GGA TGG AGC GTG CAG GTG GGA CAA ACC TTA	TTT GAC GCT GCC AAA TTT GCA CAA TAC CGC
gly trp ser val gln val gly gln thr leu	phe asp ala ala lys phe ala gln tyr arg
421/141	451/151
CAA AGC AGG TTC GAT ACG CAG GCT GCA GAA	CAG CGT TTC GAT GCG GCA CGC GAA GAA TTG
gln ser arg phe asp thr gln ala ala glu	gln arg phe asp ala ala arg glu glu leu
481/161	511/171
CTG TTG AAA GTT GCC GAA AGT TAT TTC AAC	GTT TTA CTC AGC CGA GAC ACC GTT GCC GCC
leu leu lys val ala glu ser tyr phe asn	val leu leu ser arg asp thr val ala ala
541/181	571/191
CAT GCG GCG GAA AAA GAG GCT TAT GCC CAG	CAG GTA AGG CAG GCG CAG GCT TTA TTC AAT
his ala ala glu lys glu ala tyr ala gln	gln val arg gln ala gln ala leu phe asn
601/201	631/211
AAA GGT GCT GCC ACC GCG CTG GAT ATT CAC	GAA GCC AAA GCC GGT TAC GAC AAT GCC CTG
lys gly ala ala thr ala leu asp ile his	glu ala lys ala gly tyr asp asn ala leu
661/221	691/231
GCC CAA GAA ATC GCC GTA TTG GCT GAG AAA	CAA ACC TAT GAA AAC CAG TTG AAC GAC TAC
ala gln glu ile ala val leu ala glu lys	gln thr tyr glu asn gln leu asn asp tyr
721/241	751/251
ACC GAC CTG GAT AGC AAA CAA ATC GAG GCC	ATA GAT ACC GCC AAC CTG TTG GCA CGC TAT
thr asp leu asp ser lys gln ile glu ala	ile asp thr ala asn leu leu ala arg tyr
781/261	811/271
CTG CCC AAG CTG GAA CGT TAC AGT CTG GAT	GAA TGG CAG CGC ATT GCC TTA TCC AAC AAT
leu pro lys leu glu arg tyr ser leu asp	glu trp gln arg ile ala leu ser asn asn
841/281	871/291
CAT GAA TAC CGG ATG CAG CAG CTT GCC CTG	CAA AGC AGC GGA CAG GCG CTT CGG GCA GCA
his glu tyr arg met gln gln leu ala leu	gln ser ser gly gln ala leu arg ala ala
901/301	931/311
CAG AAC AGC CGC TAT CCC ACC GTT TCT GCC	CAT GTC GGC TAT CAG AAT AAC CTC TAC ACT
gln asn ser arg tyr pro thr val ser ala	his val gly tyr gln asn asn leu tyr thr
961/321	991/331
TCA TCT GCG CAG AAT AAT GAC TAC CAC TAT	CGG GGC AAA GGG ATG AGC GTC GGC GTA CAG
ser ser ala gln asn asn asp tyr his tyr	arg gly lys gly met ser val gly val gln
1021/341	1051/351
TTG AAT TTG CCG CTT TAT ACC GGC GGA GAA	TTG TCG GGC AAA ATC CAT GAA GCC GAA GCG
leu asn leu pro leu tyr thr gly gly glu	leu ser gly lys ile his glu ala glu ala
1081/361	1111/371
CAA TAC GGG GCC GCC GAA GCA CAG CTG ACC	GCA ACC GAG CGG CAC ATC AAA CTC GCC GTA
gln tyr gly ala ala glu ala gln leu thr	ala thr glu arg his ile lys leu ala val
1141/381	1171/391
CGC CAG GCT TAT ACC GAA AGC GGT GCG GCG	CGT TAC CAA ATC ATG GCG CAA GAA CGG GTT
arg gln ala tyr thr glu ser gly ala ala	arg tyr gln ile met ala gln glu arg val
1201/401	1231/411

TTG GAA AGC AGC CGT TTG AAA CTG AAA TCG ACC GAA ACC GGC CAA CAA TAC GGC ATC CGC  
leu glu ser ser arg leu lys leu lys ser thr glu thr gly gln gln tyr gly ile arg  
1261/421 1291/431  
AAC CGG CTG GAA GTA ATA CGG GCG CGG CAG GAA GTC GCC CAA GCA GAA CAG AAA CTG GCT  
asn arg leu glu val ile arg ala arg gln glu val ala gln ala glu gln lys leu ala  
1321/441 1351/451  
CAA GCA CGG TAT AAA TTC ATG CTG GCT TAT TTG CGC TTG GTG AAA GAG AGC GGG TTA GGG  
gln ala arg tyr lys phe met leu ala tyr leu arg leu val lys glu ser gly leu gly  
1381/461  
TTG GAA ACG GTA TTT GCG GAA TAA  
leu glu thr val phe ala glu OCH

SEQ ID n°32

SEQ ID n°31

1/1

31/11

ATG AAA CAA TCC GCC CGA ATA AAA AAT ATG	GAT CAG ACA TTA AAA AAT ACA TTG GGC ATT
Met lys gln ser ala arg ile lys asn met	asp gln thr leu lys asn thr leu gly ile
61/21	91/31
TGC GCG CTT TTA GCC TTT TGT TTT GGC GCG	GCC ATC GCA TCA GGT TAT CAC TTG GAA TAT
cys ala leu leu ala phe cys phe gly ala	ala ile ala ser gly tyr his leu glu tyr
121/41	151/51
GAA TAC GGC TAC CGT TAT TCT GCC GTG GGT	GCT TTG GCT TCG GTT GTA TTT TTA TTA TTA
glu tyr gly tyr arg tyr ser ala val gly	ala leu ala ser val val phe leu leu leu
181/61	211/71
TTG GCA CGC GGT TTC CCG CGC GTT TCT TCA	GTT GTT TTA CTG ATT TAC GTC GGC ACA ACC
leu ala arg gly phe pro arg val ser ser	val val leu leu ile tyr val gly thr thr
241/81	271/91
GCC CTA TAT TTG CCG GTC GGC TGG CTG TAT	GGT GCG CCG TCT TAT CAG ATA GTC GGT TCG
ala leu tyr leu pro val gly trp leu tyr	gly ala pro ser tyr gln ile val gly ser
301/101	331/111
ATA TTG GAA AGC AAT CCT GCC GAG GCG CGT	GAA TTT GTC GGC AAT CTT CCC GGG TCG CTT
ile leu glu ser asn pro ala glu ala arg	glu phe val gly asn leu pro gly ser leu
361/121	391/131
TAT TTT GTG CAG GCA TTA TTT TTC ATT TTT	GGC TTG ACA GTT TGG AGA TAT TGT GTA TCG
tyr phe val gln ala leu phe phe ile phe	gly leu thr val trp arg tyr cys val ser
421/141	451/151
GGG GGG GTA TTT GCT GAC GTA AAA AAC TAT	AAA CGC CGC AGC AAA ATA TGG CTG ACT ATA
gly gly val phe ala asp val lys asn tyr	lys arg arg ser lys ile trp leu thr ile
481/161	511/171
TTA TTG ACT TTG ATT TTG TCC TGC GCG GTG	ATG GAT AAA ATC GCC AGC GAT AAA GAT TTG
leu leu thr leu ile leu ser cys ala val	met asp lys ile ala ser asp lys asp leu
541/181	571/191
CGA GAA CCT GAT GCC GGC CTG TTG TTG AAT	ATT TTC GAC CTG TAT TAC GAT TTG GCT TCC
arg glu pro asp ala gly leu leu leu asn	ile phe asp leu tyr tyr asp leu ala ser
601/201	631/211
GCG CCG GCA CCA ATA TGT CGC CAA GCG CGC	CCA CAT TTT GGA AGC AGC AAA AAA AGC GTC
ala pro ala pro ile cys arg gln ala arg	pro his phe gly ser ser lys lys ser val
661/221	691/231
AAC ATG GCA TAT CCG TCA TGT TGC GCC CAA	GTA TAA
asn met ala tyr pro ser cys cys ala gln	val OCH

SEQ ID n°34

SEQ ID n°33

1/1

ATG AAT GTT TAC GGT TTC CCA TTG CCC GAT	31/11	ACG CCT TTT TTG AGT CGG ACC AAA GGG CTG
Met asn val tyr gly phe pro leu pro asp		thr pro phe leu ser arg thr lys gly leu
61/21	91/31	
TTG ATA AAC GGT TAC CAT TTC ACC GCC CAC		GCG ACG AAT CTT TCG CTG CCG CAG ACT TTG
leu ile asn gly tyr his phe thr ala his		ala thr asn leu ser leu pro gln thr leu
121/41	151/51	
GGG CTG CCG GGA GAG CCG AAC AAT AAC ATT		GTC AGC TTG GCG AAG CAG GCG GGT TTT CGG
gly leu pro gly glu pro asn asn asn ile		val ser leu ala lys gln ala gly phe arg
181/61	211/71	
ACG GCG TGG CTG TCT AAT CAA GGA ATG TTG		GGG CAT TTT GCC AAC GAA ATT TCC ACC TAT
thr ala trp leu ser asn gln gly met leu		gly his phe ala asn glu ile ser thr tyr
241/81	271/91	
GCC CTA CGC AGC GAT TAT CCG TGG TTT ACC		CAA AGG GGT GAT TAT GGC AAA AGC GCG GGG
ala leu arg ser asp tyr pro trp phe thr		gln arg gly asp tyr gly lys ser ala gly
301/101	331/111	
TTG AGC GAC CGC CTT TTG TTG CCG GCG TTC		AAA CGG GTT TTG ATA GGA AAT GCA GGC ACG
leu ser asp arg leu leu leu pro ala phe		lys arg val leu ile gly asn ala gly thr
361/121	391/131	
AAG CCT CGG CTG ATT GTG ATG CAC CTG ATG		GGT TCG CAC AGT GAT TTT TGC ACA CGT TTG
lys pro arg leu ile val met his leu met		gly ser his ser asp phe cys thr arg leu
421/141	451/151	
GAT AAG GAT GCG CGG CGG TTT CAG TAT CAA		ACT GAA AAA ATA TCC TGC TAT GTT TCC ACC
asp lys asp ala arg arg phe gln tyr gln		thr glu lys ile ser cys tyr val ser thr
481/161	511/171	
ATC GCG CAA ACC GAT AAA TTT TTA GAA GAT		ACA GTT AAG ATA TTG AAT GAA AAT AAA GAA
ile ala gln thr asp lys phe leu glu asp		thr val lys ile leu asn glu asn lys glu
541/181	571/191	
AGC TGG TCT TTG GTT TAC TTT TCC GAC CAC		GGT TTG ATG CAT GTC GGT AAA GGC GGC GAG
ser trp ser leu val tyr phe ser asp his		gly leu met his val gly lys gly gly glu
601/201	631/211	
CGA ACG TTG ACA CAT GGT GCG TGG AAG CGT		CAA AGC TAC GGC GTG CCG CTG GTT AAA ATT
arg thr leu thr his gly ala trp lys arg		gln ser tyr gly val pro leu val lys ile
661/221	691/231	
TCG TCC GAT GAC ACG CGG CGC GAA ATG ATT		AAA GTG AGG CGC AGC GCG TTT AAT TTT TTA
ser ser asp asp thr arg arg glu met ile		lys val arg arg ser ala phe asn phe leu
721/241	751/251	
CGC GGA TTC GGC AGT TGG ACG GGT ATC GAA		ACC GAC GAG TTG CCC GAT GAC GGC TAT GAT
arg gly phe gly ser trp thr gly ile glu		thr asp glu leu pro asp asp gly tyr asp
781/261	811/271	
TTT TGG GGG AAT GTT CCC GAT GTG CAG GGC		GAA GGC AAT AAC CTT GCC TTT ATC GAC GGA
phe trp gly asn val pro asp val gln gly		glu gly asn asn leu ala phe ile asp gly
841/281	871/291	
CTG CCC GAC GAC CCC GCG CCG TGG TAT GCG		GGA AAA GGC AAA TCG ACT AAA AAT ACG TCT
leu pro asp asp pro ala pro trp tyr ala		gly lys gly lys ser thr lys asn thr ser
901/301		
AAA AAA TGA		
lys lys OPA		

SEQ ID n°36

SEQ ID n°35

```

1/1
ATG ATG AGT CAA CAC TCT GCC GGA GCA CGT TTC CGC CAA GCC GTG AAA GAA TCG AAT CCG
Met met ser gln his ser ala gly ala arg phe arg gln ala val lys glu ser asn pro
61/21
CTT GCC GTC GCC GGT TGC GTC AAT GCT TAT TTT GCA CGA TTG GCC ACC CAA AGC GGT TTC
leu ala val ala gly cys val asn ala tyr phe ala arg leu ala thr gln ser gly phe
121/41
AAA GCC ATC TAT CTG TCC GGC GGC GGC GTG GCA GCC TGT TCT TGC GGT ATC CCT GAT TTG
lys ala ile tyr leu ser gly gly gly val ala ala cys ser cys gly ile pro asp leu
181/61
GGC ATT ACC ACA ATG GAA GAT GTG CTG ATC GAC GCA CGA CGC ATT ACG GAC AAC GTG GAT
gly ile thr thr met glu asp val leu ile asp ala arg arg ile thr asp asn val asp
241/81
ACG CCT CTG CTG GTG GAC ATC GAT GTG GGT TGG GGC GGT GCA TTC AAT ATT GCC CGT ACC
thr pro leu leu val asp ile asp val gly trp gly gly ala phe asn ile ala arg thr
301/101
ATT CGC AAC TTT GAA CGC GCC GGT GTT GCA GCG GTT CAC ATC GAA GAT CAG GTA GCG CAA
ile arg asn phe glu arg ala gly val ala ala val his ile glu asp gln val ala gln
361/121
AAA CGC TGC GGC CAC CGT CCG AAC AAA GCC ATT GTA TCT AAA GAT GAA ATG GTC GAC CGT
lys arg cys gly his arg pro asn lys ala ile val ser lys asp glu met val asp arg
421/141
ATC AAA GCT GCC GTA GAT GCG CGC GTT GAT GAG AAC TTC GTG ATT ATG GCG CGT ACC GAT
ile lys ala ala val asp ala arg val asp glu asn phe val ile met ala arg thr asp
481/161
GCG CTG GCG GTA GAA GGT TTG GAT GCC GCT ATC GAA CGC GCC CAA GCT TGT GTC GAA GCC
ala leu ala val glu gly leu asp ala ala ile glu arg ala gln ala cys val glu ala
541/181
GGT GCG GAC ATG ATT TTC CCT GAA GCC ATG ACC GAT TTG AAC ATG TAC CGC CAA TTT GCA
gly ala asp met ile phe pro glu ala met thr asp leu asn met tyr arg gln phe ala
601/201
GAT GCG GTG AAA GTG CCC GTG TTG GCG AAC ATT ACC GAG TTT GGT TCC ACT CCG CTT TAT
asp ala val lys val pro val leu ala asn ile thr glu phe gly ser thr pro leu tyr
661/221
ACC CAA AGC GAG CTG GCT GAA AAC GGC GTG TCG CTG GTG CTG TAT CCG CTG TCA TCG TTC
thr gln ser glu leu ala glu asn gly val ser leu val leu tyr pro leu ser ser phe
721/241
CGT GCA GCA AGC AAA GCC GCT CTG AAT GTT TAC GAA GCG ATT ATG CGC GAT GGC ACT TCA
arg ala ala ser lys ala ala leu asn val tyr glu ala ile met arg asp gly thr ser
781/261
GGC GGC GGT GGT GGA CAG TAT GCA AAC CCG TGC CGA GCT GTA CGA GCA TCT GAA CTA TCA
gly gly gly gly gly gln tyr ala asn pro cys arg ala val arg ala ser glu leu ser
841/281
TGC CTT CGA GCA AAA ACT GGA TAA
cys leu arg ala lys thr gly OCH

```

SEQ ID n°38

SEQ ID n°37

1/1	31/11
ATG CCT TCG AGC AAA AAC TGG ATA AAT TGT	TTC AAA AAT GAT TTA CCG CTT TCA GAC TGC
Met pro ser ser lys asn trp ile asn cys	phe lys asn asp leu pro leu ser asp cys
61/21	91/31
CTT TCA ACA AAT CCG CAT CGG TCG TCT GAA	AAC CCG AAA CCC ATA AAA ACA CAA AGG AGA
leu ser thr asn pro his arg ser ser glu	asn pro lys pro ile lys thr gln arg arg
121/41	151/51
AAT ACC ATG ACT GAA ACT ACT CAA ACC CCG	ACC CTC AAA CCT AAA AAA TCC GTT GCG CTT
asn thr met thr glu thr thr gln thr pro	thr leu lys pro lys lys ser val ala leu
181/61	211/71
TCT GGC GTT GCG GCC GGT AAT ACC GCT TTG	TGT ACC GTT GGC CGT ACC GGC AAC GAT TTG
ser gly val ala ala gly asn thr ala leu	cys thr val gly arg thr gly asn asp leu
241/81	271/91
AGC TAT CGC GGT TAC GAC ATT CTG GAT TTG	GCA CAA AAA TGT GAG TTT GAA GAA GTT GCC
ser tyr arg gly tyr asp ile leu asp leu	ala gln lys cys glu phe glu glu val ala
301/101	331/111
CAC CTG CTG ATT CAC GGC CAT TTA CCC AAC	AAA TTC GAG CTG GCC GCT TAT AAA GCC AAG
his leu leu ile his gly his leu pro asn	lys phe glu leu ala ala tyr lys ala lys
361/121	391/131
CTC AAA TCC ATG CGC GGC CTG CCT ATC CGT	GTG ATT AAA GTT TTG GAA AGC CTG CCT GCA
leu lys ser met arg gly leu pro ile arg	val ile lys val leu glu ser leu pro ala
421/141	451/151
CAT ACC CAT CCG ATG GAC GTG ATG CGT ACC	GGC GTA TCC ATG CTG GGC TGT GTT CAT CCT
his thr his pro met asp val met arg thr	gly val ser met leu gly cys val his pro
481/161	511/171
GAA CGT GAA GGC CAT CCG GAA AGC GAA GCG	CGC GAC ATT GCC GAC AAA CTG ATC GCC AGC
glu arg glu gly his pro glu ser glu ala	arg asp ile ala asp lys leu ile ala ser
541/181	571/191
CTC GGC AGT ATC CTC TTG TAC TGG TAT CAA	TAT TCG CAC AAC GGC AAA CGC ATT GAA GTT
leu gly ser ile leu leu tyr trp tyr gln	tyr ser his asn gly lys arg ile glu val
601/201	631/211
GAA AGC GAA GAA GAG ACC ATC GGC GGT CAT	TTC CTG CAC CTG TTG CAC GGC AAA CGC CCA
glu ser glu glu glu thr ile gly gly his	phe leu his leu leu his gly lys arg pro
661/221	691/231
AGC GAA TCA CAC ATC AAA GCC ATG CAC GTT	TCA CTG ATT CTG TAT GCC GAA CAC GAG TTC
ser glu ser his ile lys ala met his val	ser leu ile leu tyr ala glu his glu phe
721/241	751/251
AAC GCT TCT ACC TTT ACC GCC CGC GTG ATC	GCC GGT ACA GGC TCT GAT ATG TAC TCC AGC
asn ala ser thr phe thr ala arg val ile	ala gly thr gly ser asp met tyr ser ser
781/261	811/271
ATT ACC GGA GCA ATC GGC GCG TTG AAA GGT	CCG AAA CAC GGC GGC GCG AAC GAA GGG CTT
ile thr gly ala ile gly ala leu lys gly	pro lys his gly gly ala asn glu gly leu
841/281	871/291
ACG ATA TTC AAA AAC GCT ACC GCA ATG CCG	ACG AAG CCG ACA TCC GCG AAC GCA
thr ile phe lys asn ala thr ala met pro	thr lys pro lys pro thr ser ala asn ala
901/301	
TCG GCC GCA AAG AAA TCG TGA	
ser ala ala lys lys ser OPA	

SEQ ID n°40

SEQ ID n°39

1/1	31/11
ATG CAC CTA TGT GGA AAG TAT TAT GGA GTA	AAT ATG AAG CTG CGT GAT TTA CTG ATG GGA
Met his leu cys gly lys tyr tyr gly val	asn met lys leu arg asp leu leu met gly
61/21	91/31
ATA TTC TTG GCA GTT TCT GCG GCC CTT CTG	AAT GCA ACC ATC GGC ATA TTC AGC AAG ATA
ile phe leu ala val ser ala ala leu leu	asn ala thr ile gly ile phe ser lys ile
121/41	151/51
TTG ATG GAG CAG GGC TTG TCT GTT CAG CAT	ATT GCA TTT TTG AAA ACT TTG ACA GGT TTC
leu met glu gln gly leu ser val gln his	ile ala phe leu lys thr leu thr gly phe
181/61	211/71
GTG TTT ATC AGC ATT TTG CTT TGC CGT ACC	GGT TTT ACC AGA CAG ATT GCG GAT ATT TCA
val phe ile ser ile leu leu cys arg thr	gly phe thr arg gln ile ala asp ile ser
241/81	271/91
AGA AAG AAA GAG GCA ATT TTG CCG TTG CTG	TTA AAA GTA GCA ATT TGT GCT TTT TTC GGA
arg lys lys glu ala ile leu pro leu leu	leu lys val ala ile cys ala phe phe gly
301/101	331/111
ATT TAT ACG TTG TTT TTC TTT GAA ACC ACA	GCT TAT CAA TAT GGC AAT GCT GCG AAT GTA
ile tyr thr leu phe phe phe glu thr thr	ala tyr gln tyr gly asn ala ala asn val
361/121	391/131
GTA GTT GTA TTA ATG GCA TCG GCT GCC GTA	TCT GCC TTG ATA TTG GAC AGC ATA CTG TTA
val val val leu met ala ser ala ala val	ser ala leu ile leu asp ser ile leu leu
421/141	451/151
GAT GAA CGT ATT TGC ATT TCT TCA GTC GTC	GGT GTG GGT TTG GCA GTA TTG GGG ATC GCA
asp glu arg ile cys ile ser ser val val	gly val gly leu ala val leu gly ile ala
481/161	511/171
ATG ATT TCT TGG ACT GGA GAA GGA AGT TTA	GGG TTG ATT CTG AAT GCC GCA CTG GCG GGC
met ile ser trp thr gly glu gly ser leu	gly leu ile leu asn ala ala leu ala gly
541/181	571/191
TCG GGC TAC GGT TGT TTT TCC GTT TTG ATT	AAG AAA TTC GGC CTA AAC GGC GGT ATT TAT
ser gly tyr gly cys phe ser val leu ile	lys lys phe gly leu asn gly gly ile tyr
601/201	631/211
TTG ACA CGG ATA TTG ATG TTT TTT GGA AGT	ATT TTT TTG TTT ATC CCT TCA TTG GAA GGT
leu thr arg ile leu met phe phe gly ser	ile phe leu phe ile pro ser leu glu gly
661/221	691/231
ATT GAG GAT ATA CAT TGG CAA TGG TCT TTT	ATT CCG CCA CTC TTG GCA TTG TCT TTA TTG
ile glu asp ile his trp gln trp ser phe	ile pro pro leu leu ala leu ser leu leu
721/241	751/251
CCG ACG ATT TTA GGA TTT TAT TGT ACA ACT	AAA GCA TTG GAT TAT TTG AGT GCT GCG AAG
pro thr ile leu gly phe tyr cys thr thr	lys ala leu asp tyr leu ser ala ala lys
781/261	811/271
GTA CAG GTA ACT GAA TTG GCC GAG CCA TTG	TTT GCT GCC GTA CTG GCT TGG TTG TTT TTG
val gln val thr glu leu ala glu pro leu phe	ala ala val leu ala trp leu phe leu
841/281	871/291
AAT GAA ATA CCG GAA GGA CGC TTC TTT GTC	GGC GCC ATT CTG ATT ATT GCC GGT ATT GTG
asn glu ile pro glu gly arg phe phe val	gly ala ile leu ile ile ala gly ile val
901/301	931/311
TCT ATC AAT GGG CTG TAT CGA CCA TTG TTG	AAG CGA ATT GAA TAA
ser ile asn gly leu tyr arg pro leu leu lys	arg ile glu OCH

SEQ ID n°42

SEQ ID n°41

```

1/1
ATG GCT GCC AAC CAA CGT TAC CGC AAA CCG 31/11
Met ala ala asn gln arg tyr arg lys pro leu pro gly thr asp leu glu tyr tyr asp
61/21
GCG CGT GCG GCG TGT GAG GAC ATC AAG CCC 91/31
ala arg ala ala cys glu asp ile lys pro gly ser tyr asp lys leu pro tyr thr ser
121/41
CGC ATT TTG GCG GAG AAT TTG GTC AAC CGC 151/51
arg ile leu ala glu asn leu val asn arg ala asp lys val asp leu pro thr leu gln
181/61
AGC TGG CTG GGT CAG CTG ATT GAG GGA AAA 211/71
ser trp leu gly gln leu ile glu gly lys gln glu ile asp phe pro trp tyr pro ala
241/81
CGG GTG GTG TGC CAC GAT ATT CTG GGG CAG 271/91
arg val val cys his asp ile leu gly gln thr ala leu val asp leu ala gly leu arg
301/101
GAT GCG ATT GCC GAA AAA GGC GGC GAT CCT 331/111
asp ala ile ala glu lys gly gly asp pro ala lys val asn pro val val ala lys pro
361/121
AGC TTC ATC GTC GAC CAC TCT CTG GCC GTT 391/131
ser phe ile val asp his ser leu ala val glu cys gly gly tyr asp pro asp ala phe
421/141
CGC AAA AAC CGC CAA ATC GAA GAC AGA CGT 451/151
arg lys asn arg gln ile glu asp arg arg asn glu asp arg phe his phe ile asn trp
481/161
ACA AAA ACC GCA TTT GAA AAT GTG GAC GTG 511/171
thr lys thr ala phe glu asn val asp val ile pro ala gly asn gly ile met his gln
541/181
ATC AAT CTA GAA AAA ATG TCG CCC GTC GTC 571/191
ile asn leu glu lys met ser pro val val CAA GTC AAA AAC GGC GTG GCG TTC CCC GAT
601/201
ACC TGC GTC GGC ACG GAT TCG CAC ACG CCG 631/211
thr cys val gly thr asp ser his thr pro CAC GTC GAT GCG CTG GGC GTG ATT TCC GTG
661/221
GGC GTG GGC GGA TTG GAA GCG GAA ACC GTG 691/231
gly val gly gly leu glu ala glu thr val ATG CTG GGT CGC GCG TCC ATG ATG CGC CTG
721/241
CCC GAT ATT GTC GGC GTT GAG CTG AAC GGC 751/251
pro asp ile val gly val glu leu asn gly lys arg gln ala gly ile thr ala thr asp
781/261
ATT GTG TTG GCA CTG ACC GAG TTT CTG CGC 811/271
ile val leu ala leu thr glu phe leu arg lys glu arg val val gly ala phe val glu
841/281
TTC TTC GGC GAG GGC GCG AGA AGC CTG TCT 871/291
phe phe gly glu gly ala arg ser leu ser ATC GGC GAC CGC GCG ACC ATT TCC AAC ATG
901/301
ACG CCG GAG TTC GGC GCG ACT GCC GCG ATG 931/311
thr pro glu phe gly ala thr ala ala met TTC GCT ATT GAT GAG CAA ACC ATT GAT TAT
961/321
TTG AAA CTG ACC GGA CGC GAC GAC GCG CAG 991/331
leu lys leu thr gly arg asp asp ala gln GTG AAA TTG GTG GAA ACC TAC GCC AAA ACC
1021/341
GCA GGC TTA TGG GCA GAT GCC TTG AAA ACC 1051/351
ala gly leu trp ala asp ala leu lys thr GCC GTT TAT CCG CGC GTT TTG AAA TTT GAT
1081/361
TTG AGC AGC GTA ACG CGC AAT ATG GCA GGC 1111/371
leu ser ser val thr arg asn met ala gly CCG AGC AAC CCG CAC GCG CGT TTT GCG ACC
1141/381
GCC GAT TTG GCC AGC AAA GGC TTG GCT AAA 1171/391
ala asp leu ala ser lys gly leu ala lys CCT TAC GAA GAG CCT TCA GAC GGC CAA ATG
ala asp leu ala ser lys gly leu ala lys pro tyr glu glu pro ser asp gly gln met

```

1201/401  
 CCC GAC GGC GCG GTC ATC ATC GCC GCG ATT  
 pro asp gly ala val ile ile ala ala ile  
 1261/421  
 AAC GTT GTT GCC GCC GCG CTC TTG GCG CGC  
 asn val val ala ala ala leu leu ala arg  
 1321/441  
 CCG TGG GTC AAA ACC TCG TTT GCC CCC GGT  
 pro trp val lys thr ser phe ala pro gly  
 1381/461  
 GCA GGC CTG CTG CCC GAA ATG GAA AAA CTC  
 ala gly leu leu pro glu met glu lys leu  
 1441/481  
 ACC TGC AAC GGC ATG AGT GGC GCG CTG GAT  
 thr cys asn gly met ser gly ala leu asp  
 1501/501  
 GAT TTG TAC GCC ACC GCC GTA TTA TCA GGC  
 asp leu tyr ala thr ala val leu ser gly  
 1561/521  
 TAT GCG AAA CAG GCT TTC CTC GCT TCG CCT  
 tyr ala lys gln ala phe leu ala ser pro  
 1621/541  
 AGT ATC CGT TTC GAT ATT GAA AAC GAC GTA  
 ser ile arg phe asp ile glu asn asp val  
 1681/561  
 CTG AAA GAC ATT TGG CCT GCC GAT GAA GAA  
 leu lys asp ile trp pro ala asp glu glu  
 1741/581  
 CCG CAG CAG TTC CGC GAT GTG TAT GTA CCG  
 pro gln gln phe arg asp val tyr val pro  
 1801/601  
 CCT AGT CCG CTG TAC GAT TGG CGT CCG ATG  
 pro ser pro leu tyr asp trp arg pro met  
 1861/621  
 GAA GGC GCG CTG GCA GGG GAA CGC ACA TTA  
 glu gly ala leu ala gly glu arg thr leu  
 1921/641  
 GAC AAC ATC ACC ACC GAC CAC CTC TCG CCG  
 asp asn ile thr thr asp his leu ser pro  
 1981/661  
 GGC GAG TAT TTG GCG AAA ATG GGT TTG CCT  
 gly glu tyr leu ala lys met gly leu pro  
 2041/681  
 CGC GGC GAC CAC TTG ACC GCC CAA CGC GCT  
 arg gly asp his leu thr ala gln arg ala  
 2101/701  
 ATG GTG AAA AAC GAA GAC GGC AGC GTG CGC  
 met val lys asn glu asp gly ser val arg  
 2161/721  
 GGC GAA ACC ATG CGC ATG TGG GAA GCC ATC  
 gly glu thr met arg met trp glu ala ile  
 2221/741  
 ATC ATC ATT GCC GGT GCG GAC TAT GGT CAA  
 ile ile ile ala gly ala asp tyr gly gln  
 2281/761  
 GTA CGC CTC GCC GGC GTA GAA GCG ATT GTT  
 val arg leu ala gly val glu ala ile val  
 2341/781  
 AAC CTT ATC GGC ATG GGC GTG TTG CCG CTG  
 asn leu ile gly met gly val leu pro leu  
 2401/801  
 CTG CAA CTG GAC GGT ACG GAA ACC TAC GAC  
 leu gln leu asp gly thr glu thr tyr asp  
 2461/821  
 CTG ACC CTC GTG ATT CAC CGT AAA AAC GGC  
 leu thr leu val ile his arg lys asn gly  
 2521/841  
 CTC GAT ACT GCA GAA GAA GTA TTG GTA TAT  
 leu asp thr ala glu glu val leu val tyr  
 1231/411  
 ACC AGT TGC ACC AAC ACT TCC AAC CCG CGC  
 thr ser cys thr asn thr ser asn pro arg  
 1291/431  
 AAC GCC AAC TGC TTC GGG CTG AAA CGC AAA  
 asn ala asn cys phe gly leu lys arg lys  
 1351/451  
 TCG AAA GTG GCG GAA ATT TAT TTG AAA GAA  
 ser lys val ala glu ile tyr leu lys glu  
 1411/471  
 GGC TTC GGT ATC GTC GCC TTC GCC TGC ACC  
 gly phe gly ile val ala phe ala cys thr  
 1471/491  
 CCG AAA ATC CAG AAA GAA ATC ATC GAC CGC  
 pro lys ile gln lys glu ile ile asp arg  
 1531/511  
 AAC CGC AAC TTC GAC GGC CGT GTC CAT CCG  
 asn arg asn phe asp gly arg val his pro  
 1591/531  
 CCG TTG GTC GTT GCC TAC GCG CTG GCA GGC  
 pro leu val val ala tyr ala leu ala gly  
 1651/551  
 CTC GGC GTT GCA GAC GGC AAG GAA ATC CGC  
 leu gly val ala asp gly lys glu ile arg  
 1711/571  
 ATC GAT GCC GTC GTT GCC GAA TAT GTG AAA  
 ile asp ala val val ala glu tyr val lys  
 1771/591  
 ATG TTC GAC ACC GGC ACA GCG CAA AAA GCA  
 met phe asp thr gly thr ala gln lys ala  
 1831/611  
 TCC ACC TAC ATC CGC CGT CCG CCT TAC TGG  
 ser thr tyr ile arg arg pro pro tyr trp  
 1891/631  
 AGA GGT ATG CGT CCG CTG GCG ATT TTG CCC  
 arg gly met arg pro leu ala ile leu pro  
 1951/651  
 TCC AAT GCG ATT TTG GCC GTC AGT GCC GCA  
 ser asn ala ile leu ala val ser ala ala  
 2011/671  
 GAA GAA GAC TTC AAC TCT TAC GCA ACC CAC  
 glu glu asp phe asn ser tyr ala thr his  
 2071/691  
 ACC TTC GCC AAT CCG AAA CTG TTT AAC GAA  
 thr phe ala asn pro lys leu phe asn glu  
 2131/711  
 CAA GGC TCG TTC GCC CGC GTC GAA CCC GAA  
 gln gly ser phe ala arg val glu pro glu  
 2191/731  
 GAA ACC TAT ATG AAC CGC AAA CAG CCG CTC  
 glu thr tyr met asn arg lys gln pro leu  
 2251/751  
 GGC TCA AGC CGC GAC TGG GCT GCA AAA GGC  
 gly ser ser arg asp trp ala ala lys gly  
 2311/771  
 GCC GAA GGC TTC GAG CGT ATC CAC CGC ACC  
 ala glu gly phe glu arg ile his arg thr  
 2371/791  
 CAG TTC AAA CCC GAC ACC AAC CGC CAT ACC  
 gln phe lys pro asp thr asn arg his thr  
 2431/811  
 GTG GTC GGC GAA CGC ACA CCG CGC TGC GAC  
 val val gly glu arg thr pro arg cys asp  
 2491/831  
 GAA ACC GTC GAA GTT CCC GTT ACC TGC CGC  
 glu thr val glu val pro val thr cys arg  
 2551/851  
 GAA GCC GGC GGC GTG TTG CAA CGG TTT GCA  
 glu ala gly gly val leu gln arg phe ala

2581/861

CAG GAT TTT TTG GAA GGG AAC GCG GCT TAG  
gln asp phe leu glu gly asn ala ala AMB

---

SEQ ID n°44

SEQ ID n°43

1/1	31/11
ATG CCG CAA ATT AAA ATT CCC GCC GTT TAC	TAC CGT GGC GGT ACA TCA AAA GGC GTG TTT
Met pro gln ile lys ile pro ala val tyr	tyr arg gly gly thr ser lys gly val phe
61/21	91/31
TTC AAA CGT TCC GAC CTG CCC GAG GCG GCG	CGG GAA GCG GGA AGC GCA CGC GAC AAA ATC
phe lys arg ser asp leu pro glu ala ala	arg glu ala gly ser ala arg asp lys ile
121/41	151/51
CTC TTG CGC GTA CTC GGC AGC CCG GAC CCC	TAC GGC AAG CAG ATA GAC GGT TTG GGC AAC
leu leu arg val leu gly ser pro asp pro	tyr gly lys gln ile asp gly leu gly asn
181/61	211/71
GCC AGT TCG TCC ACC AGC AAA GCC GTG ATT	TTG GAC AAG TCC GAA CGC ACC GAT CAC GAT
ala ser ser ser thr ser lys ala val ile	leu asp lys ser glu arg thr asp his asp
241/81	271/91
GTC GAT TAC CTT TTC GGG CAA GTT TCC ATC	GAC AAA CCT TTT GTC GAT TGG AGT GGC AAC
val asp tyr leu phe gly gln val ser ile	asp lys pro phe val asp trp ser gly asn
301/101	331/111
TGC GGC AAC CTC ACC GCC GCC GTG GGC GCA	TTT GCC ATC GAG CAA GGC TTG GTC GAT AAA
cys gly asn leu thr ala ala val gly ala	phe ala ile glu gln gly leu val asp lys
361/121	391/131
TCC AAA ATC CCT TCA GAC GGC CCG TGT ACC	GTC AAA ATC TGG CAG AAA AAC ATC GGC AAA
ser lys ile pro ser asp gly pro cys thr	val lys ile trp gln lys asn ile gly lys
421/141	451/151
ACC ATT ATT GCC CAT GTA CCG ATG CAA AAC	GGC GCA GTT TTG GAA ACA GGC GAT TTT GAG
thr ile ile ala his val pro met gln asn	gly ala val leu glu thr gly asp phe glu
481/161	511/171
CTC GAC GGC GTA ACG TTC CCG GCA GCC GAA	GTA CAA ATC GAA TTT CTT GAT CCA GCC GAC
leu asp gly val thr phe pro ala ala glu	val gln ile glu phe leu asp pro ala asp
541/181	571/191
GGC GAA GGC AGT ATG TTC CCA ACC GGC AAT	TTG GTC GAT GAA ATT GAT GTG CCG AAT ATA
gly glu gly ser met phe pro thr gly asn	leu val asp glu ile asp val pro asn ile
601/201	631/211
GGC CGT TTG AAA GCC ACG CTC ATC AAC GCG	GGC ATT CCG ACC GTT TTC CTG AAT GCC GCC
gly arg leu lys ala thr leu ile asn ala	gly ile pro thr val phe leu asn ala ala
661/221	691/231
GAC TTG GGC TAC ACG GGC AAA GAG TTG CAA	GAC GAC ATC AAC AAC GAT GCC GCA GCT TTG
asp leu gly tyr thr gly lys glu leu gln	asp asp ile asn asn asp ala ala ala leu
721/241	751/251
GAA AAA TTC GAG AAA ATC CGC GCT TAC GGT	GCG CTG AAA ATG GGT CTA ATC AGC GAC GTA
glu lys phe glu lys ile arg ala tyr gly	ala leu lys met gly leu ile ser asp val
781/261	811/271
TCC GAA GCT GCC GCC CGC GCG CAC ACG CCG	AAA GTC GCC TTC GTC GCG CCC GCC GCC GAT
ser glu ala ala ala arg ala his thr pro	lys val ala phe val ala pro ala ala asp
841/281	871/291
TAC ACC GCC TCC AGT GGC AAA ACC GTG AAT	GCC GCC GAC ATC GAT TTG CTG GTA CGC GCC
tyr thr ala ser ser gly lys thr val asn	ala ala asp ile asp leu leu val arg ala
901/301	931/311
CTG AGC ATG GGC AAA TTG CAC CAC GCG ATG	ATG GGT ACC GCC TCT GTT GCC ATT GCG ACC
leu ser met gly lys leu his his ala met	met gly thr ala ser val ala ile ala thr
961/321	991/331
GCC GCC GCC GTG CCC GGT ACG CTG GTC AAC	CTT GCC GCA GGG GCG GGA ACG CGT AAA GAA
ala ala ala val pro gly thr leu val asn	leu ala ala gly ala gly thr arg lys glu
1021/341	1051/351
GTG CGC TTC GGG CAT CCT TCC GGC ACA TTG	CGC GTC GGT GCA GCC GCC GAA TGT CAG GAC
val arg phe gly his pro ser gly thr leu	arg val gly ala ala ala glu cys gln asp
1081/361	1111/371
GGA CAA TGG ACG GCC ACC AAA GCG GTT ATG	AGC CGC AGC GCA CGC GTG ATG ATG GAA GGT
gly gln trp thr ala thr lys ala val met	ser arg ser ala arg val met met glu gly
1141/381	
TGG GTC AGG GTG CCG GAA GAT TGT TTT TAA	
trp val arg val pro glu asp cys phe OCH	

SEQ ID n°46

SEQ ID n°45

1/1

31/11

ATG CGC ACG CCG TTT TGT TGG GCA TAC GCC	AAT GCC GCC CGA ATA TCG GCA ATG CTG CCG
Met arg thr pro phe cys trp ala tyr ala	asn ala ala arg ile ser ala met leu pro
61/21	91/31
GCG TGT TGG GCG CAG GCG ATG TTG GCC GAA	GTA ATC AGC TGC AAC AAG GCT TCG TCG CTG
ala cys trp ala gln ala met leu ala glu	val ile ser cys asn lys ala ser ser leu
121/41	151/51
CCG CAG CCT TCG GCG AGA TCG GCG TTT AAA	TCA ACC TGC TTC ATG GGT GAT TCT CCG TAT
pro gln pro ser ala arg ser ala phe lys	ser thr cys phe met gly asp ser pro tyr
181/61	211/71
TTG GTT CAG ATA GAC TTG GTT TTT GCG CCG	CAG GGC GGT GGC TTC TTT CAA GCC GAT TAT
leu val gln ile asp leu val phe ala pro	gln gly gly gly phe phe gln ala asp tyr
241/81	271/91
TTT GAA TTT GAC TTT GCT GCC GAA GCG CAC	CTG TGC CAG CCT GCC CAA ATC GGC GGC GGC
phe glu phe asp phe ala ala glu ala his	leu cys gln pro ala gln ile gly gly gly
301/101	331/111
AAC GGT AGC GAT TTT CGG ATA ACC GCC GGT	GGT TTG CGC ATC GGC CAG CAG GAT AAT CGG
asn gly ser asp phe arg ile thr ala gly	gly leu arg ile gly gln gln asp asn arg
361/121	391/131
TTT GCC GCC GGG CGG CAC CTG CAC GGT TCC	TGC CTG AAC AGC GTG GGA CAG CAT TTC CAA
phe ala ala gly arg his leu his gly ser	cys leu asn ser val gly gln his phe gln
421/141	451/151
AGG TTG CGA CAG GGT CAG CGG CTG TCC GTC	GAA GCG GTA GCC CAT GCG GTT GCT ATC GCT
arg leu arg gln gly gln arg leu ser val	glu ala val ala his ala val ala ile ala
481/161	511/171
TTG CAG CGT CCA CGT TTC CCG TTC CAG ATT	CAG ACG CCC TTT TTC ACT GAA AGC GGC ATA
leu gln arg pro arg phe pro phe gln ile	gln thr pro phe phe thr glu ser gly ile
541/181	571/191
TTC CGA CGA AGG AAC AAG GTG GAT GGT ATC	GGT AAA CGG TAT CGG GGC AAT GCC GAC TTT
phe arg arg arg asn lys val asp gly ile	gly lys arg tyr arg gly asn ala asp phe
601/201	631/211
GGA CAA TTC CTG CGC ACC TTT GCC GAT GGG	GAG ATA ATC GCC TTT TTG CAG CAT TCT GCC
gly gln phe leu arg thr phe ala asp gly	glu ile ile ala phe leu gln his ser ala
661/221	691/231
CTG ATG GCC GCC GAA ACC GGC TTT CAG GTC	GGT GCT TCT CGA ACC CAT CAC TTC CGG CAC
leu met ala ala glu thr gly phe gln val	gly ala ser arg thr his his phe arg his
721/241	751/251
ATC AAA TCC GCC CGC CAC GCA CAC ATA GCC	GTA CAT GCC CTG CAC GGC ACG CAC CAT TTT
ile lys ser ala arg his ala his ile ala	val his ala leu his gly thr his his phe
781/261	811/271
CAA GGT CTG CCC TTT GCG GGC GGT ATA ACG	CCA ATA CGA ATA GAC CGG TTC GCC GTC CAA
gln gly leu pro phe ala gly gly ile thr	pro ile arg ile asp arg phe ala val gln
841/281	871/291
TTC CGC CTG ATA CAC GGC ACC GGT GAG ACA	AAA CGG CGT ATC CCG TTC AAA CAC CAG CAT
phe arg leu ile his gly thr gly glu thr	lys arg arg ile pro phe lys his gln his
901/301	931/311
TAT CCC GCC CAA AGC GAT TTC GAT TGC GGC	CGT GCC TTC GTC GTT GCC CAA TAA
tyr pro ala gln ser asp phe asp cys gly	arg ala phe val val ala gln OCH

SEQ ID n°48

SEQ ID n°47

1/1

ATG AGA ATA GAG ATC ACA CCA ATC AGC GAA TCC GCT TTG GTC TGC CGA CTG AAT GCG CCT  
 Met arg ile glu ile thr pro ile ser glu ser ala leu val cys arg leu asn ala pro  
 61/21  
 TCC GAA CTG GGC AAA CAG CAA AAG TTG TGG GCG TTT GCC GCT GCG CTC GGG CAG CAC GAC  
 ser glu leu gly lys gln gln lys leu trp ala phe ala ala ala leu gly gln his asp  
 121/41  
 AGG ATT GAG GAA GTG GTG GTC GGC ATG AAC AAT CTG ACC GTG TTC ACC CGT TTC GAT ACC  
 arg ile glu glu val val val gly met asn asn leu thr val phe thr arg phe asp thr  
 181/61  
 GAT TTG GCG ACG CTT GCC GAT GAA TTG CAA TAT GTG TGG GAA CAC ACC GCC GTT ACA GAC  
 asp leu ala thr leu ala asp glu leu gln tyr val trp glu his thr ala val thr asp  
 241/81  
 CAT CAG GGC AAA CTG GTG GAA ATT CCC GTC TGC TAC GGC GGC GAA TAC GGC CCG GAT TTG  
 his gln gly lys leu val glu ile pro val cys tyr gly gly glu tyr gly pro asp leu  
 301/101  
 GCG GAA GTC GCT GCT TTC CAT CAG ACG GTT ATT TCC GAA ATC GTC CGC CGC CAT ACG GCG  
 ala glu val ala ala phe his gln thr val ile ser glu ile val arg arg his thr ala  
 361/121  
 CAA ACT TAT ACC GTA TTT ATG ATG GGC TTC CAG CCT GGT TTC CCT TAT CTG GGC GGC TTG  
 gln thr tyr thr val phe met met gly phe gln pro gly phe pro tyr leu gly gly leu  
 421/141  
 CCC GAA GCA TTG CAC ACG CCC CGC CGT GCC GTG CCG AGA ACG TCC GTT CCT GCC GGT TCG  
 pro glu ala leu his thr pro arg arg ala val pro arg thr ser val pro ala gly ser  
 481/161  
 GTC GGT ATC GGC GGC AGT CAG ACC GGT GTG TAT CCG TTC GCT TCG CCC GGC GGC TGG CAG  
 val gly ile gly gly ser gln thr gly val tyr pro phe ala ser pro gly gly trp gln  
 541/181  
 ATT ATC GGC AGA ACC GAA TTA CCC TTG TTC CGA GCC GAT TTG AAT CCG CCG ACC CTG CTG  
 ile ile gly arg thr glu leu pro leu phe arg ala asp leu asn pro pro thr leu leu  
 601/201  
 GCG GCG GGT GAC CAA GTC CGC TTT GTT GCA GAA AGG ATT GAG CCA TGA  
 ala ala gly asp gln val arg phe val ala glu arg ile glu pro OPA

31/11

TCC GCT TTG GTC TGC CGA CTG AAT GCG CCT  
 ser ala leu val cys arg leu asn ala pro  
 91/31

GCG TTT GCC GCT GCG CTC GGG CAG CAC GAC  
 ala phe ala ala ala leu gly gln his asp  
 151/51

AAT CTG ACC GTG TTC ACC CGT TTC GAT ACC  
 asn leu thr val phe thr arg phe asp thr  
 211/71

TAT GTG TGG GAA CAC ACC GCC GTT ACA GAC  
 tyr val trp glu his thr ala val thr asp  
 271/91

GGC GGC GAA TAC GGC CCG GAT TTG  
 cys tyr gly gly glu tyr gly pro asp leu  
 331/111

ATT TCC GAA ATC GTC CGC CGC CAT ACG GCG  
 ile ser glu ile val arg arg his thr ala  
 391/131

CAG CCT GGT TTC CCT TAT CTG GGC GGC TTG  
 gln pro gly phe pro tyr leu gly gly leu  
 451/151

GTG CCG AGA ACG TCC GTT CCT GCC GGT TCG  
 val pro arg thr ser val pro ala gly ser  
 511/171

TAT CCG TTC GCT TCG CCC GGC GGC TGG CAG  
 tyr pro phe ala ser pro gly gly trp gln  
 571/191

CGA GCC GAT TTG AAT CCG CCG ACC CTG CTG  
 arg ala asp leu asn pro pro thr leu leu  
 631/211

GAA AGG ATT GAG CCA TGA  
 glu arg ile glu pro OPA

-SEQ ID n°50

-SEQ ID n°49

```

1/1
ATG ATT CAC GTT TCG GCA GTG CAG GCA CCG 31/11
Met ile his val ser ala val gln ala pro ala his ile gln asp thr gly arg tyr gly
61/21
CAC CGG CGT TAC GGC ATC GGT CAT GCC GGT GCG ATG GAC ACG GTT GCT TTG GCG GCG GGT
his arg arg tyr gly ile gly his ala gly ala met asp thr val ala leu ala ala gly
121/41
AAT ATT TTA TTG GGC AAC GAC GAA GGC ACG GCC GCA ATC GAA ATC GCT TTG GGC GGG ATA
asn ile leu leu gly asn asp glu gly thr ala ala ile glu ile ala leu gly gly ile
181/61
ATG CTG GTG TTT GAA CGG GAT ACG CCG TTT TGT CTC ACC GGT GCC GTG TAT CAG GCG GAA
met leu val phe glu arg asp thr pro phe cys leu thr gly ala val tyr gln ala glu
241/81
TTG GAC GGC GAA CCG GTC TAT TCG TAT TGG CGT TAT ACC GCC CGC AAA GGG CAG ACC TTG
leu asp gly glu pro val tyr ser tyr trp arg tyr thr ala arg lys gly gln thr leu
301/101
AAA ATG GTG CGT GCC GTG CAG GGC ATG TAC GGC TAT GTG TGC GTG GCG GGC GGA TTT GAT
lys met val arg ala val gln gly met tyr gly tyr val cys val ala gly gly phe asp
361/121
GTG CCG GAA GTG ATG GGT TCG AGA AGC ACC GAC CTG AAA GCC GGT TTC GGC GGC CAT CAG
val pro glu val met gly ser arg ser thr asp leu lys ala gly phe gly gly his gln
421/141
GGC AGA ATG CTG CAA AAA GGC GAT TAT CTC CCC ATC GGC AAA GGT GCG CAG GAA TTG TCC
gly arg met leu gln lys gly asp tyr leu pro ile gly lys gly ala gln glu leu ser
481/161
AAA GTC GGC ATT GCC CCG ATA CCG TTT ACC GAT ACC ATC CAC CTT GTT CCT TCG TCG GAA
lys val gly ile ala pro ile pro phe thr asp thr ile his leu val pro ser ser glu
541/181
TAT GCC GCT TTC AGT GAA AAA GGG CGT CTG AAT CTG GAA CGG GAA ACG TGG ACG CTG CAA
tyr ala ala phe ser glu lys gly arg leu asn leu glu arg glu thr trp thr leu gln
601/201
AGC GAT AGC AAC CGC ATG GGC TAC CGC TTC GAC GGA CAG CCG CTG ACC CTG TCG CAA CCT
ser asp ser asn arg met gly tyr arg phe asp gly gln pro leu thr leu ser gln pro
661/221
TTG GAA ATG CTG TCC CAC GCT GTT CAG GCA GGA ACC GTG CAG GTG CCG CCC GGC GGC AAA
leu glu met leu ser his ala val gln ala gly thr val gln val pro pro gly gly lys
721/241
CCG ATT ATC CTG CTG GCC GAT GCG CAA ACC ACC GGC GGT TAT CCG AAA ATC GCT ACC GTT
pro ile ile leu leu ala asp ala gln thr thr gly gly tyr pro lys ile ala thr val
781/261
GCC GCC GCC GAT TTG GGC AGG CTG GCA CAG GTG CGC TTC GGC AGC AAA GTC AAA TTC AAA
ala ala ala asp leu gly arg leu ala gln val arg phe gly ser lys val lys phe lys
841/281
ATA ATC GGC TTG AAA GAA GCC ACC GCC CTG 871/291
ile ile gly leu lys glu ala thr ala leu arg arg lys asn gln val tyr leu asn gln
901/301
ATA CGG AGA ATC ACC CAT GAA GCA GGT TGA
ile arg arg ile thr his glu ala gly OPA

```

SEQ ID n°52

SEQ ID n°51

1/1	ATG AAT TCG ACC GCA AGT AAA ACC CTG AAA	31/11	GGA TTG TCG CTG GTG TTT TTC GCC TCT GGA
Met asn ser thr ala ser lys thr leu lys		gly leu ser leu val phe phe ala ser gly	
61/21	TTC TGC GCC CTG ATT TAC CAG GTC AGC TGG	91/31	CAG AGG CTT CTA TTC AGT CAC ATA GGT ATC
phe cys ala leu ile tyr gln val ser trp		gln arg leu leu phe ser his ile gly ile	
121/41	GAT TTG AGT TCG ATT ACT GTC ATT ATT TCT	151/51	GTA TTT ATG GTC GGC TTG GGT GTA GGT GCG
asp leu ser ser ile thr val ile ile ser		val phe met val gly leu gly val gly ala	
181/61	TAT TTC GGT GGA CGC ATT GCT GAC CGT TTT	211/71	CCT TCA AGT ATC ATC CCC CTG TTT TGC ATC
tyr phe gly gly arg ile ala asp arg phe		pro ser ser ile ile pro leu phe cys ile	
241/81	GCT GAA GTA TCC ATC GGT CTG TTC GGT TTG	271/91	GTA AGC AGG GGT CTG ATT TCC GGC TTG GGG
ala glu val ser ile gly leu phe gly leu		val ser arg gly leu ile ser gly leu gly	
301/101	CAT CTT TTA GTT GAG GCT GAT TTG CCC ATC	331/111	ATC GCT GCT GCC AAT TTC CTC TTA TTG CTG
his leu leu val glu ala asp leu pro ile		ile ala ala ala asn phe leu leu leu leu	
361/121	CTT CCT ACC TTT ATG ATG GGC GCG ACC TTG	391/131	CCC TTG CTG ACC TGT TTT TTT AAC CGG AAA
leu pro thr phe met met gly ala thr leu		pro leu leu thr cys phe phe asn arg lys	
421/141	ATA CAT AAT GTT GGC GAG TCT ATC GGT ACC	451/151	TTA TAT TTT TTC AAC ACT TTG GGT GCG GCA
ile his asn val gly glu ser ile gly thr		phe phe asn thr leu gly ala ala	
481/161	CTC GGA TCG CTT GCC GCC GCC GAA TTT TTC	511/171	TAC GTC TTT TTT ACC CTC TCC CAA ACC ATT
leu gly ser leu ala ala ala glu phe phe		tyr val phe phe thr leu ser gln thr ile	
541/181	GCG CTG ACA GCC TGC TTT AAC CTT CTG ATT	571/191	GCT GCT TCA GTA TGC TGC GTT ACA GAA AGG
ala leu thr ala cys phe asn leu leu ile		ala ala ser val cys cys val thr glu arg	
601/201	ATG GAT ATA GTG AAC ACT AAA CCG AAT ACT	631/211	AGT TTG ATT TAT ATG CTT TCT TTC CTT AGC
met asp ile val asn thr lys pro asn thr		ser leu ile tyr met leu ser phe leu ser	
661/221	GGC TTA TTG AGC TTG GGT ATA GAA GTC TTG	691/231	TGG GTA AGG ATG TTT TCG TTC GCA GCA CAG
gly leu leu ser leu gly ile glu val leu		trp val arg met phe ser phe ala ala gln	
721/241	TCC GTG CCT CAG GCA TTT TCA TTT ACT CTT	751/251	GCC TAT TTT CTG ACC GGT ATC GCC GTC GGC
ser val pro gln ala phe ser phe thr leu		ala tyr phe leu thr gly ile ala val gly	
781/261	GCG TAT TTT GGC AAA CGG ATT TGC CGC AGC	811/271	CGC TTT GTT GAT ATT CCC TTT ATC GGG CAG
ala tyr phe gly lys arg ile cys arg ser		arg phe val asp ile pro phe ile gly gln	
841/281	TGC TTC TTG TGG GCG GGT ATT GCC GAC TTT	871/291	TTG ATT TTG GGT GCT GCG TGG TTG TTG ACG
cys phe leu trp ala gly ile ala asp phe		leu ile leu gly ala ala trp leu leu thr	
901/301	GGT TTT TCC GGC TTC GTC CAC CAC GCC GGT	931/311	ATC TTC ATT ACC CTG TCT GCC GTC GTC AGA
gly phe ser gly phe val his his ala gly		ile phe ile thr leu ser ala val val arg	
961/321	GGG TTG ATT TTC CCG CTC GTA CAC CAT GTG	991/331	GGT ACG GAT GGC AAC AAA TCC GGA CGA CAG
gly leu ile phe pro leu val his his val		gly thr asp gly asn lys ser gly arg gln	
1021/341	GTT TCC AAT GTT TAT TTC GCC AAC GTT GCC	1051/351	GGC AGT GCA TTG GGT CCG GTC CTT ATC GGC
val ser asn val tyr phe ala asn val ala		gly ser ala leu gly pro val leu ile gly	
1081/361	TTT GTG ATA CTT GAT TTC TTG TCC ACC CAA	1111/371	CAG ATT TAC CTG CTC ATC TGT TTG ATT TCT
phe val ile leu asp phe leu ser thr gln		gln ile tyr leu leu ile cys leu ile ser	
1141/381	GCT GCT GTC CCT TTG TTT TGT ACA CTG TTC	1171/391	CAA AAA AGT CTC CGA CTG AAT GCA GTG TCG
ala ala val pro leu phe cys thr leu phe		gln lys ser leu arg leu asn ala val ser	
1201/401		1231/411	

GTA GCA GTT TCC CTA ATG TTC GGC ATC CTC ATG TTC CTA CTG CCG GAT TCT GTC TTT CAA  
 val ala val ser leu met phe gly ile leu met phe leu leu pro asp ser val phe gln  
 1261/421 1291/431  
 AAT ATT GCT GAC CGT CCG GAT CGG CTG ATT GAA AAC AAA CAC GGC ATT GTT GCG GTT TAC  
 asn ile ala asp arg pro asp arg leu ile glu asn lys his gly ile val ala val tyr  
 1321/441 1351/451  
 CAT AGA GAT GGT GAT AAG GTT GTT TAT GGG GCG AAT GTA TAC GAC GGC GCA TAC AAT ACC  
 his arg asp gly asp lys val val tyr gly ala asn val tyr asp gly ala tyr asn thr  
 1381/461 1411/471  
 GAT GTA TTC AAT AGT GTC AAC GGC ATC GAA CGT GCC TAT CTG CTA CCC TCC CTG AAG TCT  
 asp val phe asn ser val asn gly ile glu arg ala tyr leu leu pro ser leu lys ser  
 1441/481 1471/491  
 GGC ATA CGC CGC ATT TTC GTC GTT GGA TTG AGT ACA GGT TCG TGG GCG CGC GTC TTG TCT  
 gly ile arg arg ile phe val val gly leu ser thr gly ser trp ala arg val leu ser  
 1501/501 1531/511  
 GCC ATT CCG GAA ATG CAG TCG ATG ATC GTT GCG GAA ATC AAT CCG GCA TAC CGT AGC CTT  
 ala ile pro glu met gln ser met ile val ala glu ile asn pro ala tyr arg ser leu  
 1561/521 1591/531  
 ATC GCG GAC GAG CCG CAA ATC GCC CCG CTT TTG CAG GAC AAA CGT GTT GAA ATT GTA TTG  
 ile ala asp glu pro gln ile ala pro leu leu gln asp lys arg val glu ile val leu  
 1621/541 1651/551  
 GAT GAC GGT AGG AAA TGG CTG CGT CGC CAT CCT GAT GAA AAA TTC GAC CTG ATT TTG ATG  
 asp asp gly arg lys trp leu arg arg his pro asp glu lys phe asp leu ile leu met  
 1681/561 1711/571  
 AAT ACG ACT TGG TAC TGG CGT GCC TAT TCC ACC AAC CTG TTG AGT GCG GAA TTT TTA AAA  
 asn thr thr trp tyr trp arg ala tyr ser thr asn leu leu ser ala glu phe leu lys  
 1741/581 1771/591  
 CAG GTG CAA AGC CAC CTT ACC CCG GAT GGT ATT GTA ATG TTT AAT ACC ACG CAC AGC CCG  
 gln val gln ser his leu thr pro asp gly ile val met phe asn thr thr his ser pro  
 1801/601 1831/611  
 CAT GCT TTT GCT ACC GCC GTA CAC AGT ATT CCC TAT GCA TAC CGC TAT GGG CAT ATG GTA  
 his ala phe ala thr ala val his ser ile pro tyr ala tyr arg tyr gly his met val  
 1861/621 1891/631  
 GTC GGC TCG GCA ACC CCG GTA GTT TTC CCT AAT AAA GAA CTG CTC AAG CAA CGT CTC TCC  
 val gly ser ala thr pro val val phe pro asn lys glu leu leu lys gln arg leu ser  
 1921/641 1951/651  
 CGG TTG ATT TGG CCG GAA AGC GGC AGG CAC GTA TTT GAC AGC AGC ACC GTG GAT GCT GCA  
 arg leu ile trp pro glu ser gly arg his val phe asp ser ser thr val asp ala ala  
 1981/661 2011/671  
 GCA CAA AAG GTT GTC TCT CGT ATG CTG ATT CAG ATG ACG GAA CCT TCG GCT GGG GCG GAA  
 ala gln lys val val ser arg met leu ile gln met thr glu pro ser ala gly ala glu  
 2041/681 2071/691  
 GTC ATT ACC GAC GAT AAT ATG ATT GTA GAA TAC AAA TAC GGC AGA GGG ATT TAA  
 val ile thr asp asp asn met ile val glu tyr lys tyr gly arg gly ile OCH

SEQ ID n°53

cys leu gly gly gly gly gly thr ser ala pro asp phe  
 asn ala gly gly thr gly ile gly ser asn ser arg ala thr thr ala lys ser ala ala  
 val ser tyr ala gly ile lys asn glu met cys lys asp arg ser met leu cys ala gly  
 arg asp asp val ala val thr asp arg asp ala lys ile asn ala pro pro pro asn leu  
 his thr gly asp phe thr asn pro asn asp ala tyr lys asn leu ile asn leu lys pro  
 ala ile glu ala gly tyr thr gly arg gly val glu val gly ile val asp thr gly glu  
 ser val asp gly ser ile ser phe pro glu leu tyr gly arg lys glu his gly tyr asn glu  
 asn tyr lys asn tyr thr ala tyr met arg lys glu ala pro glu asp gly gly gly lys  
 asp ile lys ala ser phe asp asp glu ala val ile glu thr glu ala lys pro thr asp  
 ile arg his val lys glu ile gly his ile asp val val ser his ile ile gly gly arg  
 ser val asp gly arg pro ala gly gly ile ala pro asp ala thr leu his ile met asn  
 thr his asp gly thr lys asn glu ile met ser ala ala ile arg asn ala trp val lys  
 leu gly glu arg gly val arg ile val asn asn ser phe gly thr thr ser arg ala gly  
 thr ala asp his phe gln ile ala asn ser glu glu gln tyr arg gln ala leu leu ala  
 tyr ser gly gly asp lys thr asp glu gly ile arg leu met gln gln ser asp tyr gly  
 asn leu ser tyr his ile arg asn lys asn met leu phe ile phe ser ala ser asn asp  
 ala gln ala gln pro asn thr leu thr leu leu pro phe tyr glu lys asp ala gln lys  
 gly ile ile thr val ala gly val asp arg ser gly glu lys phe asn gly ser asn his  
 cys gly ile thr ala met trp cys leu ser ala pro tyr glu ala ser val arg phe thr  
 arg thr asn pro ile gln ile ala gly thr ser phe ser ala pro ile val thr gly thr  
 ala ala leu leu leu gln lys tyr pro trp met ser asn asp asn leu arg thr thr leu  
 leu thr thr ala gln asp ile gly ala val gly val asp ser lys phe gly trp gly leu  
 leu asp ala gly lys ala met asn gly pro ala ser phe pro phe gly asp phe thr ala  
 asp thr lys gly thr ser asp ile ala tyr ser phe arg asn asp ile ser gly thr gly  
 gly leu ile lys lys gly gly ser gln leu gln leu his gly asn asn thr tyr thr gly  
 lys thr ile ile glu gly gly ser leu val leu tyr gly asn asn lys ser asp met arg  
 val glu thr lys gly ala leu ile tyr asn gly ala ala ser gly gly ser leu asn ser  
 asp gly ile val tyr leu ala asp thr asp arg ser gly ala asn glu thr val his ile  
 lys gly asp leu gln leu gly gly glu gly thr leu tyr thr arg leu gly lys leu leu  
 lys val asp gly thr ala met thr gly gly lys leu tyr met ser ala arg gly lys gly  
 ala gly tyr leu asn arg thr gly gln arg val pro phe leu ser ala ala lys ile gly  
 arg asp tyr ser phe phe thr asn ile glu thr asp gly gly leu leu ala ser leu asp  
 ser val glu lys thr ala gly ser glu gly asp thr leu ser tyr tyr val arg arg gly  
 asn ala ala arg thr ala ser ala ala ala his ser ala pro ala gly leu lys his ala  
 val glu gln gly gly ser asn leu glu asn leu met val glu leu asp ala ser glu ser  
 ser ala thr pro glu thr val glu thr ala ala ala asp arg thr asp met pro gly ile  
 arg pro tyr gly ala thr phe arg ala ala ala ala val gln his ala asn ala ala asp  
 gly val arg ile phe asn ser leu ala ala thr val tyr ala asp ser thr ala ala his  
 ala asp met gln gly arg arg leu lys ala val ser asp gly leu asp his asn ala thr  
 gly leu arg val ile ala gln thr gln gln asp gly gly thr trp glu gln gly gly val  
 glu gly lys met arg gly ser thr gln thr val gly ile ala ala lys thr gly glu asn  
 thr thr ala ala ala thr leu gly met gly his ser thr trp ser glu asn ser ala asn  
 ala lys thr asp ser ile ser leu phe ala gly ile arg his asp ala gly asp ile gly  
 tyr leu lys gly leu phe ser tyr gly arg tyr lys asn ser ile ser arg ser thr gly  
 ala asp glu his ala glu gly ser val asn gly thr leu met gln leu gly ala leu gly  
 gly val asn val pro phe ala ala thr gly asp leu thr val glu gly gly leu arg tyr  
 asp leu leu lys gln asp ala phe ala glu lys gly ser ala leu gly trp ser gly asn  
 ser leu thr glu gly thr leu val gly leu ala gly leu lys leu ser gln pro leu ser  
 asp lys ala val leu phe ala thr ala gly val glu arg asp leu asn gly arg asp tyr  
 thr val thr gly gly phe thr gly ala thr ala ala thr gly lys thr gly ala arg asn  
 met pro his thr arg leu val ala gly leu gly ala asp val glu phe gly asn gly trp  
 asn gly leu ala arg tyr ser tyr ala gly ser lys gln tyr gly asn his ser gly arg  
 val gly val gly tyr arg phe

Fragments du génome de *N. meningitidis* Z2491 décrits dans la demande de  
brevet WO98/02547

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 70:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 243 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 70:

GATCAGACCC ATTTTCAGCG CACCGTAAGC GCGGATTTTC TCGAATTTTT CCAAAGCTGC	60
GGCATCGTTG TTGATGTCGT CTTGCAACTC TTTGCCCCGTG TAGCCCAAGT CGGCGGCATT	120
CAGGAAAACG GTCGGAATGC CCGCGTTGAT GAGCGTGGCT TTCAAACGGC CTATATTCGG	180
CACATCAATT TCATCGACCA AATTGCCGGT TGGGAACATA CTGCCTTCGC CGTCGGCTGG	240

ATC

243

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 73:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 120 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 73:

CGGTCAGAAA CAGGCAAGGT AATGAAAATG CCTGAGGCAC GGACTGTGCT GCGAACGAAA 60

ACTCCTTACC GAAGTCTTCT ATACCCAGGC TCAATAGCCG CTCAAGGAGA GAGCTATCAT 120

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 74:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 120 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 74:

CGGTCAGAAA CAGGCAAGGT AATGAAAATG CCTGAGGCAC GGACTGTGCT GCGAACGAAA 60

ACTCCTTACC GAAGTCTTCT ATACCCAGGC TCAATAGCCG CTCAAGGAGA GAGCTATCAT 120

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 77

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 269 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 77:

CGGAGCATAA AATCGTTATT AAAGATAATG GTATAGGAAC GAGCTTCGAT GAAATCAATG	60
ATTTTTATTT GAGAATCGGT CGGAACAGAA GGGAAGAAAA ACAAGCCTCC CCGTGCGGAA	120
GAATTCCAAC GGGTAAAAAA GGCCTTGGA AATTGGCATT ATTCGGGCTT GGCAACAAAA	180
TTGAAATTC TACTATCCAG GGAAACGAAA GGGTTACTTT TACTTTGGAT TATGCAGAGA	240
TTCGAAGAAG CAAGGGTATT TATCAACCG	269

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 80:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 207 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 80:

CGGGTCGCTT TATTTTGTGC AGGCATTATT TTTCATTTTT GGCTTGACAG TTTGGAAATA	60
TTGTGTATCG GGGGGGGTA TTTGCTGACG TAAAAACTA TAAACGCCGC GCAAATATG	120
GCTGACTATA TTATTGACTT TGATTTTGTG CTGCGCGGTG ATGGATAAAA TCGCCAGCGA	180
TAAAGAATTT GCGAGAACCT GATGCCG	207

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 81 :

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 224 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 81:

CGGCAACGAT TTGAGCTATC GCGGTTACGA CATTCTGGAT TTGGCACAAA AATGCGAGTT	60
TGAAGAAGTC GCCCACCTGC TGATTCACGG CCATCTGCCC AACAAATTCG AGCTGGCCGC	120
TTATAAAACC AAGCTCAAAT CCATGCGCGG CCTGCCTATC CGTGTGATTA AAGTTTTGGA	180
AAGCCTGCCT GCACATACCC ATCCGATGGA CGTAATGCGT ACCG	224

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 87:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 273 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 87:

AATTTCCACC TATGCCCTAC GCAGCGATTA TCCGTGGTTT ACCCAAAGGG TGATTATGGC 60  
 AAAAGCGCGG GGTGAGCGA CCGCCTTTTG TTGCCGGCGT TCAAACGGGT TTTGATAGGA 120  
 AATGCAGGCA CGAAGCCTCG GCTGATTGTG ATGCACCTGA TGGGTTGCA CAGTGATTTT 180  
 TGCACACGTT TGGATAAGGA TGC GCGCGG TTT CAGTATC AAAGTAAAA AATATCCTGC 240  
 TATGTTTCCA TCAATCGCGC AAACCGATAA ATT 273

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 88:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 270 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 88:

---

AATTCTTCCG CACGGGGAGG CTTGTTTTTC TTCCCTTCTG TTCCGACCGA TTCTCAAATA 60  
 AAAATCATTG ATTTTCATCGA AGTTCATTCC TATACCATTA TCTTTAATAA CGATTTTATG 120  
 CTCCGGTTTA TCGAATAACC TAACTTCCAC TTCCGTAGCA CATGCATCGT AGGCATTTCG 180  
 TATCAACTCG GCAATCGCAG GAACAGTGTG CGAATACAAT CTTTACACCC AAATGTTTCA 240  
 TTACGGTTGG CTCGAACTC AATTTCAATT 270

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 89:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 267 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 89:

AATTATGAAC ACACGCATCA TCGTTTCGGC TGC GTTCGTT GCGTTGGCAT TAGCAGGTTG	60
CGGCTCAATC AATAATGTAA CCGTTTCCGA CCAGAACTT CAGGAACGTG CCGCGTTTGC	120
CTTGGGCGTC ACCAATGCCG TAAAAATCAG CAACCGCAGC AATGAAGGCA TACGCATCAA	180
CTTTACCGCA ACTGTGGGTA AGCGCGTGAC CAATGCTATG TTACCAGTGT AATCAGCACA	240
ATCGGCGTTA CCACTTCCGA TGCAATT	267

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 94:

## (1) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 308 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 94:

AATTTGTTGG GCAGATGGCC GTGAATCAGC AGGTGGGCGA CTTCTTCAAA CTCGCATTTT	60
TGTGCCAAAT CCAGAATGTC GTAACCGCGA TACGTCAAAT CGTTGCCGGT ACGCAACGGT	120
ACACAAAGCG GTATTACCGG CCGCAACGCC AGAAAGCGCA ACGGATTTTT AGGTTTGAGG	180
GTCGGGGTTT GAGTAGTTTC AGTCATGGTA TTTCTCCTTT GTGTTTTTAT GGGTTTCGGG	240
TTTTCAGACG ACCGATGCGG ATTTGTTGAA AGGCAGTCTG AAAGCGGTAA ATCATTTTTG	300
AAACAATT	308

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 95:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:-

- (A) LONGUEUR: 286 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

---

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 95:

AATTCGGAGG AGCAGTACCG CCAAGCGTTG CTCGCCTATT CCGGCGGTGA TAAACAGAC	60
GAGGGTATCC GCCTGATGCA ACAGAGCGAT TACGGCAACT TGTCTACCA CATCCGTAAT	120
AAAAACATGC TTTTCATTTT TTCGGCAAGC AATGACGCAC AAGCTCAGCC CAACACAAC	180
GACCCTATTG CCATTTTATG AAAAAGACGC TCAAAAAGGC ATTATCACAG TTGCAGGCGT	240
AGACCGCAGT GGAGAAAAGT TCAATGGCTC CAACCATTGC GGAATT	286

## (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 98:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 316 paires de bases
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iv) ANTI-SENS: NON

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 98

AATTTGTCGG CAATCTTCCC GGGTCGCTTT ATTTTGTGCA GGCATTATTT TTCATTTTTG	60
GCTTGACAGT TTGGAGATAT TGTGTATCGG GGGGGGGTAT TTGCTGACGT AAAAAACTAT	120
AAACGCCGCA GCAAAATATG GCTGACTATA TTATTGACTT TGATTTTGTC CTGCGCGGTG	180
ATGGATAAAA TCGCCAGCGA TAAAGATTG CGAGAACCTG ATGCCGGCCT GTTGTTGAAT	240
ATTTTCGACC TGTAATTACG ATTTGGCTTC CGCGCCGGCA CAATATGCCG CCAAGCGGCG	300
CCCACATTTT GGAAGC	316

---

## REVENDICATIONS

1. Acide nucléique sous forme ~~insolée~~, codant pour un polypeptide  
 5 spécifique des souches pathogènes du genre *Neisseria*, ou fragment  
 antigénique de celui-ci à l'exclusion des séquences SEQ ID n° 70, 73, 74, 77,  
 80, 81, 87, 88, 89, 94, 95 et 98, la séquence d'acides aminés dudit polypeptide  
 spécifique étant identique ou homologue d'une séquence choisie parmi les  
 séquences du groupe II, le groupe II étant constitué par les séquences SEQ ID  
 10 n° 2 à SEQ ID n° 52 (numéros pairs) et la séquence SEQ ID n° 53.

2. Acide nucléique selon la revendication 1 dont la séquence  
 nucléotidique est identique ou homologue d'une séquence choisie parmi les  
 séquences du groupe I, le groupe I étant constitué par les séquences SEQ ID  
 15 n° 1 à SEQ ID n° 51 (numéros pairs).

3. Polypeptide spécifique des souches pathogènes du genre  
*Neisseria*, et fragments antigéniques de celui-ci, la séquence d'acides aminés  
 dudit polypeptide spécifique étant identique ou homologue d'une séquence  
 20 choisie parmi les séquences du groupe II, constitué par les séquences SEQ ID  
 n°2 à SEQ ID n°52 (numéros pairs) et la séquence SEQ ID n°53.

---

4. Vecteur d'expression comprenant une cassette d'expression  
 dans laquelle une séquence nucléotidique telle que définie dans la  
 25 revendication 1 ou 2 est placée dans des conditions permettant son expression  
 dans une cellule hôte.

5. Cellule hôte transformée par le vecteur d'expression selon la  
 revendication 4.

30

6. Composition pharmaceutique comprenant :

a) un acide nucléique selon la revendication 1 ou 2, sous forme  
 nue ou en association avec au moins un agent facilitant la transfection ;

b) ou un vecteur vaccinal comprenant une séquence nucléotidique telle que définie dans la revendication 1 ou 2, tel que notamment un virus ou une bactérie;

c) ou un polypeptide selon la revendication 3 ;

5

éventuellement en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

7. Anticorps monospécifique dirigé contre un polypeptide selon la revendication 3.

10

8. Utilisation d'un acide nucléique selon la revendication 1 ou 2 ou d'un polypeptide spécifique des souches pathogènes de *Neisseria* ou de fragments antigéniques de celui-ci selon la revendication 3 pour la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée à la vaccination contre *Neisseria*.

---

1/1

